

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización morfométrica y aspectos filogenéticos
de cepas de rotíferos del grupo *Brachionus plicatilis*
(Rotifera: Brachionidae) utilizados en la acuicultura
peruana**

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo

AUTOR

Liz Evelyn Romero Guardamino

ASESOR

Franz Cardoso Pacheco

Víctor Hugo Vera Saldarriaga

Lima – Perú

2008

*A mis padres:
Fernando y Elisa.*

*A mí querido esposo:
Arturo Maguiña.*

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por el financiamiento parcial de la tesis y por permitirme el uso de sus laboratorios, equipos y materiales. Especialmente al Laboratorio de Biología Experimental “Felipe Ancieta Calderón”, que dirige el Blgo. Victor Hugo Vera Saldarriaga. Así también, al laboratorio de Acuicultura por permitirme trabajar en la sala de microalgas, al Laboratorio de Biología Reproductiva, especialmente a la Blga. Betsy Buitrón por darme las facilidades de trabajar en el laboratorio que esta a su cargo.

A mi asesor Blgo. Franz Cardoso Pacheco de la Universidad Nacional mayor de San Marcos por sus correcciones, apoyo y consejos. Al Blgo. Victor Hugo Vera Saldarriaga del laboratorio de Biología Experimental del IMARPE, como asesor externo de la tesis.

Al Dr. Manuel Serra del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de la Universidad de Valencia (España) por el envío de las cepas patrón de rotíferos y a la Dra. África Gómez del laboratorio de “Molecular Ecology and Evolution” de la Universidad de Hull (Inglaterra) por la obtención de las secuencias genética de las cepas que fueron utilizadas para construir los árboles filogenéticos.

A todos los que de alguna u otra manera contribuyeron a que este trabajo concluya satisfactoriamente.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 GENERALIDADES DE LOS ROTÍFEROS.	4
2.3 PROBLEMÁTICA DEL COMPLEJO <i>B. PLICATILIS</i> EN ACUICULTURA.	12
2.4 DEFINICIONES IMPORTANTES EN ACUICULTURA Y FILOGENIA EN ROTÍFEROS.	14
2.5 SISTEMÁTICA Y FILOGENIA DEL COMPLEJO <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> .	14
2.5.1 <i>Uso de Análisis Multivariado en la Sistemática del complejo Brachionus plicatilis.</i>	15
2.5.2 <i>Uso de Marcadores Moleculares en Rotíferos.</i>	17
2.5.3 <i>Sistemática y filogenia mediante el uso de marcadores moleculares en el Complejo Brachionus plicatilis.</i>	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
3.1 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS LUGARES DE COLECTA Y PROCEDENCIA DE LAS CEPAS.	20
3.2 COLECTA Y AISLAMIENTO DE CEPAS CLONALES DE ROTÍFEROS NATIVOS.	24
3.3 USO DE LAS CEPAS INTRODUCIDAS Y CEPAS PATRÓN.	25
3.4 MANTENIMIENTO DEL CEPARIO DE ROTÍFEROS.	26
3.5 CONDICIONES FÍSICOQUÍMICAS PARA LA PRUEBA DE MORFOMETRÍA.	30
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA.	30
3.7 ANÁLISIS MULTIVARIADO Y ESTADÍSTICO.	31
3.8 CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICO.	34
3.8.1 <i>Construcción de los árboles filogenéticos.</i>	34
4. RESULTADOS	36
4.1 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO.	36
4.1.1 <i>Cepa nativa VL (Fig. 13 b)</i>	36
4.1.2 <i>Cepa nativa PVL2 (Fig. 13c)</i>	37
4.1.3 <i>Cepa nativa TP (Fig. 14a)</i>	37
4.1.4 <i>Cepa introducida CA (Fig. 14a)</i>	38
4.1.5 <i>Cepa introducida CF (Fig. 13d)</i>	38
4.2 MORFOMETRÍA	43
4.2.1 <i>Análisis discriminante I</i>	45
4.2.2 <i>Análisis discriminante II</i>	49
4.2.3 <i>Análisis de las proporciones de la variables morfológicas</i>	53
4.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	54
5. DISCUSIÓN	57
5.1 MORFOMETRÍA.	57
5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	59
6. CONCLUSIONES	61
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

FIG. 1. ANATOMÍA DE <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> HEMBRA Y MACHO.	5
FIG. 2. CICLO BIOLÓGICO DEL ROTÍFERO <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i>	6
FIG. 3. <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> , HEMBRA EN VISTA VENTRAL, CARGANDO HUEVO AMÍCTICO	8
FIG. 4. ESQUEMA DE LÓRICA DE <i>BRACHIONUS SP.</i>	9
FIG. 5. DIBUJOS A CÁMARA LÚCIDA DE LAS 3 ESPECIES HERMANAS DE ROTÍFEROS PERTENECIENTES AL COMPLEJO <i>BRACHIONUS PLICATILIS</i> .	10
FIG. 6. HEMBRA DE <i>BRACHIONUS ROTUNDIFORMIS</i> EN VISTA VENTRAL, CARGANDO UN HUEVO AMÍCTICO.	10
FIG. 7. HEMBRA DE <i>BRACHIONUS IBERICUS</i> EN VISTA VENTRAL, CARGANDO UN HUEVO AMÍCTICO.	11
FIG. 8. CUERPO DE AGUA TEMPORAL EN LA DESEMBOCADURA DEL RÍO BOCAPÁN, DISTRITO DE BOCAPÁN., PROVINCIA DE CONTRALMIRANTE VILLAR, DEPARTAMENTO DE TUMBES.	20
FIG. 9. LAGUNA EL MIRADOR DE LOS HUMEDALES DE VENTANILLA, DISTRITO DE VENTANILLA, PROVINCIA DE LIMA, DEPARTAMENTO DE LIMA.	22
FIG. 10. LAGUNA MEDICINAL LA MELLICERA EN EL DISTRITO DE CHILCA, PROVINCIA DE CAÑETE.	22
FIG. 11. LAGUNA EN EL HUMEDAL DE PUERTO VIEJO, LIMA	23
FIG. 12.-CARACTERES MORFOMÉTRICOS DE LA LÓRICA DE <i>BRACHIONUS SP.</i>	33
FIG. 13. HEMBRAS AMICTICAS O PARTENOGENÉTICAS DE LAS CEPAS: A) CA (U. AGRARIA LA MOLINA), B) VL (VENTANILLA), C) PVL2 (PUERTO VIEJO 2), D) CF (FONDEPES).	40
FIG. 14. HEMBRAS AMICTICAS DE LAS CEPAS O ESPECIES: A) TP (TUMBES), B) SS2 (<i>B. ROTUNDIFORMIS</i>), C) L1 (<i>B. PLICATILIS</i>), D) SM2 (<i>B. IBERICUS</i>).	41
FIG. 16. MAPA TERRITORIAL MOSTRANDO LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE I REALIZADO USANDO LOS CARACTERES A-G (SEGÚN FU ET AL., 1991 A).	48
FIG. 17. MAPA TERRITORIAL MOSTRANDO LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE II REALIZADO USANDO LOS CARACTERES A, C, D, E, G - I, (SEGÚN CIROS-PÉREZ ET AL., 2001).	52
FIG. 18. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS CEPAS PERUANAS Y PATRÓN, OBTENIDO UTILIZANDO LAS SECUENCIAS OBTENIDAS PARA EL MARCADOR COI.	55
FIG. 19. CLADOGRAMA DE LAS CEPAS PERUANAS, PATRÓN Y SECUENCIAS DE LOS LINAJES DEL COMPLEJO <i>B. PLICATILIS</i> .	56

RESUMEN

En la actualidad, los acuicultores del mundo tienen la necesidad de disponer de cepas de rotíferos debidamente determinadas y caracterizadas, para poder optimizar el cultivo en masa de estos y evitar las posibles mortalidades repentinas en los sistemas de cultivo. En este contexto, es necesario también identificar las cepas peruanas e introducidas que están siendo utilizadas para acuicultura en el Perú. Por lo que en el presente trabajo se realizó la caracterización morfométrica de las cepas peruanas, Tumbes (TP), Puerto Viejo 2 (PVL2), Ventanilla (VL) y de 2 cepas introducidas cepa FONDEPES (CF) y Universidad Agraria “La Molina” (CA).

El estudio morfométrico se realizó con rotíferos de la misma cohorte, los cuales fueron cultivados bajo el diseño del jardín común. Como cepas patrón se utilizaron 3 cepas de las especies de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis* (*Brachionus plicatilis* s. s. (cepa L1), *B. rotundiformis* (cepa SS2) y *B. ibericus* (cepa SM2). La caracterización morfométrica se realizó mediante el análisis discriminante por pasos, utilizando para ello 9 caracteres morfométricos, y como confirmación se realizaron 6 análisis de varianza entre las proporciones de los caracteres medidos.

El análisis morfométrico discriminó 4 grupos: El primero incluye a la cepa SM2 (*B. ibericus*), el segundo a la cepa SS2 (*B. rotundiformis*), el tercero agrupó a las cepa L1 (*B. plicatilis* s. s) y la cepa introducida CA y el cuarto agrupó a las cepas nativas TP (Tumbes), PVL2 (Puerto Viejo 2), VL (Ventanilla) y a la cepa introducida CF.

Por otro lado, se enviaron muestras de las cepas L1, SS2, CHL (cepa colectada en Chilca, Lima), VL, PVL1 (cepa de una colecta previa pero en el mismo lugar que PVL2), y CA, a la Universidad de Hull (Inglaterra), para obtener secuencias del marcador molecular COI (Citocromo Oxidasa Sub Unidad I). Con estas secuencias y 7 secuencias adicionales se construyeron 2 árboles filogenéticos.

El análisis filogenético revela que las cepas PVL1 y CHL, pertenecen al linaje *Brachionus* sp. CAYMAN (99% de Booststrap), la cepa VL al linaje *Brachionus* sp. ALMENARA (100% de Booststrap) y la cepa CA a la especie *Brachionus plicatilis* s. s.

En conclusión, según el análisis morfométrico las cepas peruanas y la cepa CF no se adscriben a ninguna de las 3 especies utilizadas como patrón. El análisis filogenético confirma que la cepa Agraria (CA) es un *Brachionus plicatilis* s. s. Adicionalmente, se reporta por primera vez para el Perú, la presencia de los linajes *Brachionus* sp. CAYMAN y *Brachionus* sp. ALMENARA.

ABSTRACT

Aquaculturists of the world need to determine and characterize the strains they culture as live food, in order to optimize the mass culture of them and to avoid crashes. In this context, it is necessary to determine the Peruvian strains and the introduced ones which are used in aquaculture in Peru. In the present work was made a morphometric characterization of 3 native strains :Tumbes (TP), Puerto Viejo 2 (PVL2), Ventanilla (VL), and 2 introduced: FONDEPES (CF) y Universidad Agraria “La Molina” (CA), these strains are used in aquaculture centers in Peru.

The morphometric characterization was performed using rotifers of the same cohort and grown under a common garden design, and as reference strains were used 3 species of the *Brachionus plicatilis* complex: *Brachionus plicatilis* s. s. (L1 strain), *B. rotundiformis* (SS2 strain) and *B. ibericus* (SM2 strain). The morphometric characterization was performed using the step wise discriminant analysis; In addition, 6 ANOVAS were made using the ratios of the morphometric characters measured.

The morphometric analysis formed 4 groups: the first, include the strain SM2 (*B. ibericus*); the second, the strain SS2 (*B. rotundiformis*); the third, grouped L1 strain (*B. plicatilis*) and CA (Univ. Agraria La Molina), and finally the fourth group include the natives strains: TP (Tumbes), PVL2 (Puerto Viejo 2), VL (Ventanilla) and the introduced CF (FONDEPES).

Additionally, fixed samples of the strains L1, SS2, CHL (strain from Chilca, Lima), VL; PVL1 (Strain from a previous collect of PVL2 strain but from de same place) and CA, were sent to Hull University, in order to obtain the sequences of the COI molecular marker. Two phylogenetic trees were made using these sequences and 7 additional sequences of each lineage of the complex.

The results of phylogenetic analysis reveal that the strains PVL1 and CHL belong to the *Brachionus* sp. Cayman lineage (Bootstrap 99%), the VL strain to *Brachionus* sp. Almenara (Bootstrap 100%) and the CA strain to *Brachionus plicatilis* S. S.

In conclusion, from the morphometric analysis the Peruvian strains and CF strain do not belong to none of the 3 species used as a reference. The phylogenetic analysis confirms the morphometric results, and also that the strain CA is a *Brachionus plicatilis* s. s. Finally, the presence of strains belonging to *Brachionus sp.* Cayman lineage and *Brachionus sp.* Almenara were reported.

1. INTRODUCCIÓN

Durante años se había considerado a la especie *Brachionus plicatilis* como cosmopolita, sin embargo, de acuerdo a trabajos previos se sabe en la actualidad que *B. plicatilis* es en realidad un complejo de especies (Gómez *et al.*, 2002; Gómez, 2005; Suatoni *et al.*, 2006) y que en algunos casos suelen tener distribución simpátrica (Serra *et al.*, 1998). Se conocen solo 3 morfo-especies del complejo *B. plicatilis*, estas requieren diferentes temperaturas y salinidades (Serra *et al.*, 1998; Ortells *et al.*, 2003). Las cepas de rotíferos fueron intercambiadas entre centros de larvicultura del mundo como la misma especie, diferenciándolos solo por el tamaño de lórica; pero no todas las cepas se adaptaban a las nuevas condiciones de cultivo, pudiendo ser esta una de las causas de los “crashes” que son la repentina disminución en la densidad de los cultivos, debido a la mortalidad parcial o total de rotíferos (Dooms *et al.*, 2006).

A pesar de los avances realizados en la investigación de rotíferos, su cultivo todavía presenta problemas, debido a la impredecibilidad en la ocurrencia de “crashes”, ocasionando grandes pérdidas económicas (Dhert *et al.*, 2001). Las investigaciones realizadas para descubrir la causa de los “crashes” se han enfocado mayormente en la contaminación por bacterias y protozoos, deficiencias nutricionales y aspectos fisicoquímicos del agua, pero recientemente se ha dado importancia a las diferencias genéticas entre las cepas, entendiendo que diferentes cepas pueden tener diferentes preferencias en cuanto a salinidad, temperatura y otros factores abióticos, lo cual afecta la producción en los cultivos (Dooms *et al.*, 2006).

Las larvas de peces marinos pueden alimentarse de una variedad de presas mayores a 100 micras, pero algunos peces marinos necesitan presas pequeñas, como rotíferos; El tamaño de presa está determinada por el tamaño de la boca del depredador, por ejemplo, las larvas de “anchoveta del norte” (*Engraulis mordax*), necesitan presas entre 50 a 100 μm . (Theilacker & MacMaster, 1971).

Hasta que se logren obtener dietas artificiales adecuadas, el alimento vivo continúa siendo un requerimiento indispensable para las larvas. Uno de los

alimentos utilizados en los primeros estadios larvales es el rotífero *Brachionus plicatilis*. Con la mejora en la producción masiva de este rotífero se ha logrado desarrollar exitosamente la acuicultura en el Mediterráneo (Candrea *et al.*, 1996; Dehasque *et al.*, 1997).

En el Perú, se han aislado cepas del complejo *B. plicatilis* para ser utilizadas con fines de investigación (Pisua, 1984; Barreno, 1988; Chinchayan, 1996), pero las muestras no han sido depositadas en una colección científica de referencia (que permita tener un reporte oficial de que especies del complejo *B. plicatilis* se encuentran distribuidas en nuestro país), las cepas se reportaron como *B. plicatilis*. Estas cepas fueron utilizadas en estudios en acuicultura, las cepas utilizadas por Pisua (1984), Barreno (1988), y Chinchayan (1996) se han perdido a lo largo del tiempo debido a que no se continuaron con las investigaciones, pero también debido a la ausencia de alguna institución que se encargue de mantener un cepario.

Debido a que periódicamente se recurre a nuevas colectas de rotíferos de su hábitat natural, para usarlas como alimento vivo en larvicultura de peces marinos como el “lenguado peruano” (*Paralichthys adspersus*) y para pruebas de ecotoxicidad, es cuestionable que en todos los casos se trate de la misma especie, lo cual hace improbable la repetición de los experimentos. Es por ello que para la realización de esta tesis se implementó un cepario de rotíferos en el Laboratorio de Biología Experimental “Felipe Ancieta Calderón” del Instituto de Mar del Perú (IMARPE), donde se mantienen cepas nativas e introducidas que podrían ser utilizadas por instituciones nacionales, acuicultores e investigadores.

Por lo tanto, los objetivos fueron:

1. Caracterizar morfométricamente las cepas nativas de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis*, colectadas en Tumbes (TP), Ventanilla (VL), y Puerto Viejo (PVL2).
2. Caracterizar morfométricamente las cepas introducidas de rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis*, utilizados en acuicultura: La procedente de Estados Unidos (CA) y la de Chile (CF).
3. Analizar filogenéticamente las cepas nativas procedentes de Puerto Viejo (PVL1), Ventanilla (VL) y Chilca (CHL) y la cepa introducida CA, utilizando el marcador molecular COI.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los rotíferos.

El Phylum Rotífera es un grupo de invertebrados microscópicos, pseudocelomados, no segmentados y de simetría bilateral que viven en ambientes acuáticos o semi-acuáticos. Los rotíferos poseen tres características anatómicas que los identifican: la corona, el mástax y la lórica (Fig. 1). La **corona**, que es una región anterior ciliada, la usan para locomoción, y está frecuentemente compuesta por dos bandas concéntricas ciliadas llamadas trocus y cíngulo, que al girar dan la impresión de ser ruedas, por lo que, los primeros microscopistas dieron el nombre al Phylum (*Rota*, rueda y *ferre*, cargar o poseer). El segundo carácter de los rotíferos es la faringe muscular, llamado **mástax**, que posee un juego complejo de mandíbulas duras (Trofi), esta es una característica que los diferencia de protozoarios ciliados, gastrotriquios y larvas trocóforas, ya que estos organismos no poseen trofi. Finalmente, la **lórica**, que es la pared del cuerpo o integumento, el cual es sincitial, es la tercera característica del Phylum, la pared del cuerpo está embebida de una capa de filamentos proteínicos y dependiendo del número de estos, la pared puede ser muy endurecida (Wallace *et al.*, 2006).

El número actual de especies de rotíferos es de 2030, el grupo de mayor número de especies es Monogononta (1570 especies), seguido por Bdelloidea (461 especies) y finalmente Seisonacea (3 especies) (Segers, 2007).

Los rotíferos se caracterizan por tener las tasas reproductivas más altas entre los metazoarios y son capaces de poblar rápidamente nichos vacantes, llegando a integrar hasta el 30% de la biomasa del plancton, (Nogardy *et al.*, 1993, citado por Suantika, 2001). El éxito ecológico de los rotíferos es debido, en gran parte, a su adaptación reproductiva. Su reproducción puede ser tanto sexual como por partenogénesis (Fig. 2), a este ciclo de vida se le conoce como partenogenética cíclica y depende de las condiciones ambientales y alimenticias. En la naturaleza la fase de vida partenogenética es la que predomina, pero la reproducción sexual ocurre en respuesta a ciertas condiciones ambientales (como temperatura y salinidad), también debido al incremento en la población y a cambios en la cantidad y calidad de alimento. La fase sexual implica la aparición de machos y es por un periodo breve.

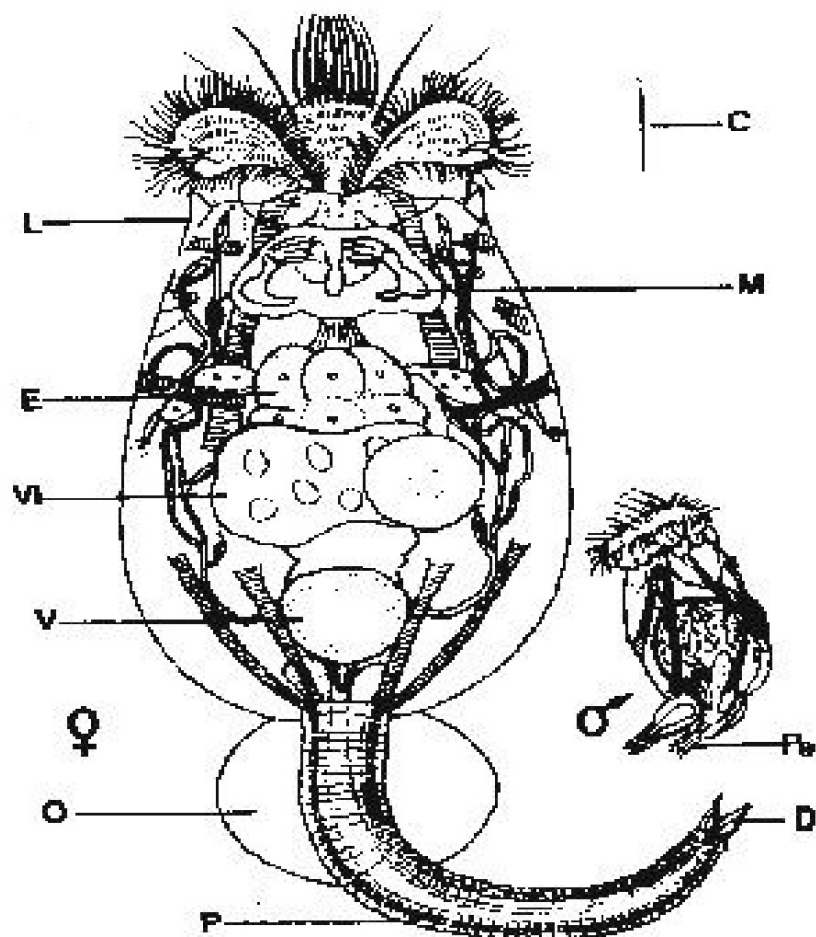


Fig. 1. Anatomía de *Brachionus plicatilis* hembra y macho. C, corona de cilios; L, lórica; E, estómago; M, mástax; Vi, ovario; V, vejiga urinaria; O, huevo; P, pie; D, dedos o apéndices adherentes; Pe, pene.

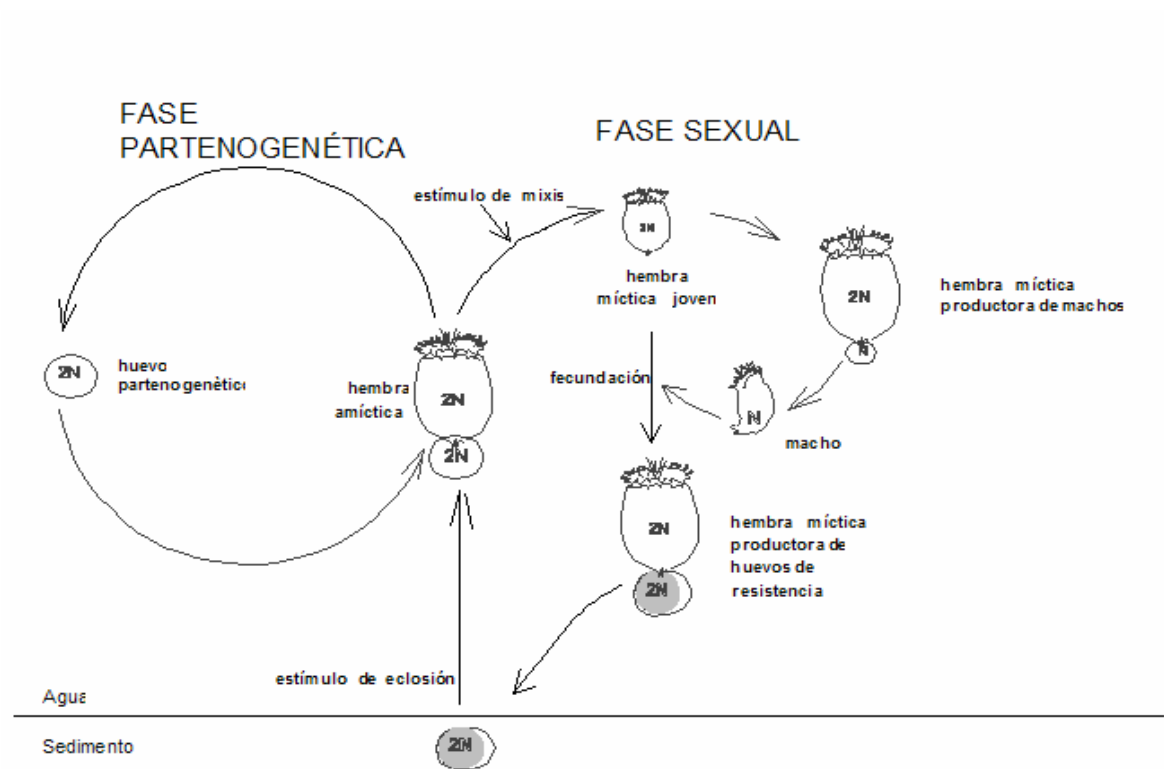


Fig. 2. Ciclo biológico del rotífero *Brachionus plicatilis* (Tomado de Ortells, 2002).

Los rotíferos monogonontos (como el género *Brachionus*) producen 2 tipos de huevos: un huevo amítico diploide que se convierte por partenogénesis en una hembra amítica, y un segundo tipo llamado huevo mítico que es haploide y de no ocurrir la fecundación, producen machos haploides por partenogénesis, pero estos huevos míticos al ser fecundados, en lugar de producir machos, secretan cascarones gruesos y resistentes formando huevos que se denominan huevos latentes o “quistes” (Fig. 2), que son capaces de soportar la deshidratación y otras condiciones adversas, no eclosionan durante varios meses o incluso años; Esta adaptación les permite sobrevivir en cuerpos de agua temporales (Wallace *et al.*, 2006).

La clasificación taxonómica según Segers (2002) del complejo *Brachionus plicatilis*, es la siguiente:

Orden:	Monogononta.
Familia:	Brachionidae Ehrenberg, 1838
Género:	Brachionus Pallas, 1766
Especies:	<i>Brachionus plicatilis</i> O. F. Müller, 1786 <i>Brachionus rotundiformis</i> . Tschugunoff, 1921 <i>Brachionus ibericus</i> Ciro-Pérez, Gómez, Serra, 2001

2.2 Breve descripción morfológica de las 3 especies descritas del complejo *B. plicatilis*.

Ciros-Pérez *et al.* (2001) redescubrieron a *Brachionus plicatilis* y *Brachionus rotundiformis* a partir de cepas aisladas en la península ibérica, con el fin permitir futuros trabajos comparativos del complejo *B. plicatilis*. Estas corresponden bien con las descripciones originales de O. F. Müller (1786) y Tschugunoff (1921), respectivamente.

A continuación se hace una breve descripción de las especies descritas para el complejo *Brachionus plicatilis*.

a) *Brachionus plicatilis* O. F. Müller, 1976 (Fig. 3)

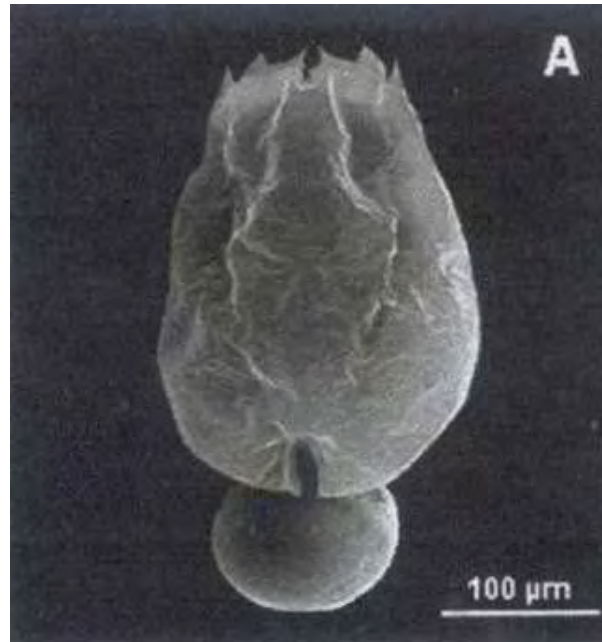


Fig. 3. *Brachionus plicatilis*, hembra en vista ventral, cargando huevo amíctico (tomada de Ciro-Pérez *et al.*, 2001)

Diagnosis:

Brachionus plicatilis Müller difiere de las otras 2 especies hermanas *B. rotundiformis* y *B. ibericus* en lo siguiente: Primero, el patrón de espinas antero-dorsales: 3 pares de espinas muy similares en longitud, las espinas internas y externas (Fig 4. Espinas 1 y 3) triangulares con una base ancha, espina media (Fig 4. Espina 2) de forma triangular pero con margen exterior sigmoidal. Segundo, la forma y la superficie topográfica de los huevos de resistencia, ovoides con superficie lisa y con pocos poros distribuidos en toda la superficie del huevo (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).



Fig. 4. Esquema de lórica de *Brachionus sp.*, las espinas anterodorsales están numeradas del 1-3. 1 es la espina interna, 2 la espina media y 3 la espina externa.

Descripción:

Hembra partenogenética: lórica suave, forma de pera (Fig 5a). Placas dorsales y ventrales fusionados lateral y posteriormente. Superficie de la lórica lisa o punteada. Margen dorsal anterior con 3 pares de espinas flanqueando un sinus en forma de “U”. Todas las espinas de la lórica son ligeramente triangulares y similares en tamaño, con base ancha y ápices relativamente puntiagudos (Fig. 5a); Margen externo de las espinas medias de forma sigmoidal con ápices afilados. Margen ventral anterior de la lórica con dos pares de lóbulos redondeados flanqueando un ligero sinus. Los lóbulos exteriores con bases mas anchas que los interiores (mas de 1.5 veces aproximadamente). Abertura del pie sub-terminal sobre la placa ventral (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

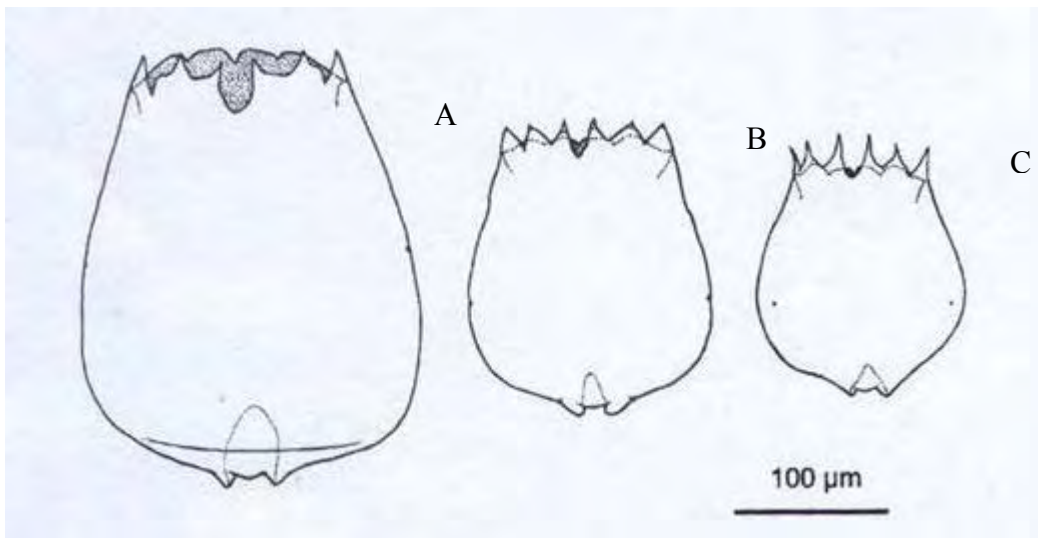


Fig. 5. Dibujos a cámara lúcida de las 3 especies hermanas de rotíferos pertenecientes al complejo *Brachionus plicatilis*. (A) *Brachionus plicatilis*, (B) *Brachionus ibericus*, (C) *Brachionus rotundiformis*. Tomado de Ciro-Pérez *et al.* (2001).

b) *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 (Fig. 6).

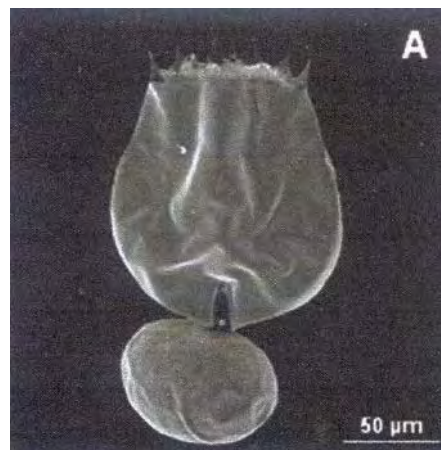


Fig 6. Hembra de *Brachionus rotundiformis* en vista ventral, cargando un huevo amíctico. (Tomada de Ciro-Pérez *et al.*, 2001)

Diagnosis:

Brachionus rotundiformis difiere de las otras 2 especies hermanas, *B. plicatilis* y *B. ibericus* en lo siguiente. Primero, el patrón de espinas antero-dorsales. Tres pares de espinas triangulares, puntiagudas; la espina media (Fig. 4, Espina 2) más corta

que las otras. Segundo, lórica de forma semi-circular y dorso-ventralmente comprimida. Tercero, la longitud del cuerpo es menor que *B. plicatilis* y *B. ibericus*. Cuarto, la forma y superficie topográfica de los huevos de resistencia que son de forma arriñonada con una superficie ligeramente aspera y con abundantes poros distribuidos irregularmente por toda la superficie del huevo (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

Descripción:

Hembra partenogenética: lórica suave, casi circular (Fig. 5C) y dorso-ventralmente comprimida. Placas dorsal y ventral fusionadas lateralmente y posteriormente. Superficie de la lórica lisa. Margen dorsal anterior con 3 pares de espinas, triangulares y puntiagudas flanqueando un sinus en forma de “U”. La espina media es la mas corta de las 3, con la característica de tener una forma acuminada. Margen anterior ventral con 2 pares de lóbulos flanqueando un ligero sinus; lóbulos interiores de forma aproximadamente cuadrangular, y los externos ligernamente redondeados; los últimos están seguidos por un margen recto que alcanza los márgenes laterales de la lórica. Abertura del pie en posición sub-terminal y en la placa ventral (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

c) *Brachionus ibericus* Ciros-Pérez, Gómez, Serra, 2001 (Fig. 7).

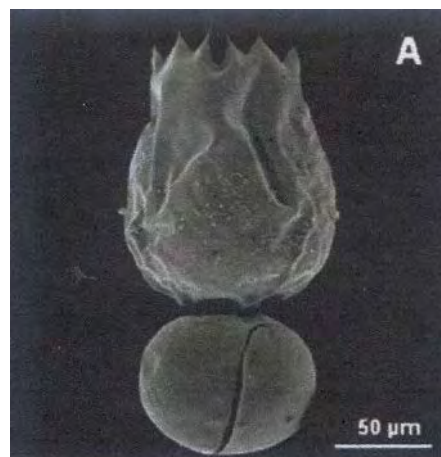


Fig. 7. Hembra de *Brachionus ibericus* en vista ventral, cargando un huevo amictico.
(Tomada de Ciros-Pérez *et al.*, 2001)

Diagnosis:

Brachionus ibericus puede ser distinguido de las otras 2 especies pertenecientes al complejo *B. plicatilis* de en lo siguiente: Primero, el patrón de espinas antero-dorsales, con 3 pares de espinas que son similares en longitud, la espina media tiene una forma de triangulo equilatero, a diferencia de *B. plicatilis* y *B. rotundiformis* (Fig. 3). Segundo, por la forma y superficie topográfica de los huevos de resistencia, los cuales tienen forma ovoide, con una superficie aspera caracterizado por un patrón curvado de rugosidades y con poros densamente distribuidos en toda la superficie del huevo. Tercero, el modo de cargar el huevo de resistencia es diferente, este permanecen dentro de la lórica (Un solo huevo de resistencia por hembra) (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

Descripción:

Hembra partenogenética: lórica relativamente suave y flexible, de forma ovoide (Fig. 5B). La abertura de la lórica relativamente ancha. La superficie de la lórica lisa. Margen antero-dorsal con 6 espinas puntiagudas y triangulares, todas de tamaño similar, 3 en cada lado de un sinus en forma de “V”. El arreglo de las espinas es constante en todos los clones; la espina interior (Fig. 4, espina 1) es la más prominente, las espinas internas (Fig. 2, espinas 3) menos desarrollada. Las espinas medias (Fig. 4, espina 2) de forma similar a un triangulo equilatero. Margen anterior ventral con dos pares de lóbulos flanqueando un estrecho sinus; los lóbulos externos ligeramente más anchos que los internos. Abertura del pie sub-terminal, sobre la placa ventral (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

2.3 Problemática del complejo *B. plicatilis* en acuicultura.

Los rotíferos del complejo *Brachionus plicatilis* han sido y son utilizados mundialmente como alimento vivo para estadios iniciales de peces en cultivo. Estos rotíferos, comunes en ambientes salobres, incluyen las cepas anteriormente conocidas por los acuicultores como cepas S (“Small”) de 100 a 210 μm de longitud de lórica y la cepas L (“Large”) de 103-340 μm de longitud de lórica, ahora descritas como *Brachionus rotundiformis* y *Brachionus plicatilis*, respectivamente (Segers,1995). En Japón, estos rotíferos fueron previamente conocidos como organismos dañinos, los cuales causaban el llamado

“Mizukawari” (rápido cambio del color del agua) en estanques de cultivos de anguilas (Hagiwara *et al.*, 2001).

Problemas frecuentes como la reducción o la pérdida total en la producción de rotíferos, que causan grandes pérdidas en larvicultura y que provocan un gran impacto económico, han sido abordados desde el punto de vista del manejo de las condiciones de cultivo y el de contaminación bacteriana (Dooms *et al.*, 2006). Cabe señalar que se ha realizado poco esfuerzo en la selección de rotíferos, aparte de las consideraciones zootécnicas, y esta selección nunca ha sido considerada en la acuicultura comercial y las cepas de rotíferos han sido intercambiadas sin ninguna preocupación por las consecuencias en las propiedades genéticas de varios clones (Dhert *et al.*, 2001).

Las causas genéticas de los “crashes” han sido raramente consideradas debido a la falta de información o a la falta de experiencia, es así que la identificación de especies estaba basada en criterios morfológicos, que son la base del intercambio de rotíferos entre instituciones acuícolas. Estudios realizados en especies crípticas de rotíferos silvestres han revelado que ellos difieren en cuanto a las preferencias en parámetros ecológicos y ciclos de vida, por lo tanto, se comportarían de manera diferente de acuerdo a las condiciones de cultivo. Por consiguiente, es posible que los rotíferos intercambiados no puedan adaptarse a las condiciones locales de cultivo de las nuevas ecloserías, resultando en bajos niveles de producción (Dooms *et al.*, 2006).

En el Perú, se han realizado aislamientos de cepas de rotíferos para trabajos específicos, por ejemplo, Pisua (1984), realizó un estudio preliminar sobre el cultivo de una población de *Brachionus plicatilis* aislada de las salinas de Puerto Chicama, la especie fue determinada por el Dr. Peter Heussler, pero no se menciona en el trabajo los criterios que fueron utilizados para su determinación. Barreno (1988), aisló una cepa de rotífero procedente de las lagunas de Puerto Viejo (Km. 70 de la Panamericana Sur), la cepa fue enviada para su determinación al Georgia Institute of Technology (USA), al Dr. Terry W. Snell, quien la determinó como *Brachionus plicatilis* (Muller, 1786), dicha cepa de rotífero fue probada como sustituto de *Artemia* sp. en el cultivo larval de *Macrobrachium rosenbergii*. Finalmente, Chinchayan (1996) investigó el consumo de la microalga *Nannochloropsis oculata* por el rotífero *Brachionus plicatilis* (Línea S), la cepa provino del Kanagawa International Fisheries Training Center (KIFTC)

en Japón. Así mismo en el Instituto del Mar de Perú (IMARPE), se vienen utilizando desde hace varios años, dos cepas del complejo *Brachionus* sp. aisladas en Chilca y Puerto Viejo (al sur de Lima).

2.4 Definiciones importantes en acuicultura y filogenia en rotíferos.

Dooms *et al.*, (2006), definieron algunos términos utilizados en acuicultura y sistemática: La población de rotíferos de una eclosería o de alguna institución científica es llamada “**cepa**”. Una muestra de una cepa puede contener más de un haplotipo (genotipo de un cromosoma simple o de un grupo haploide de cromosomas, se le conoce también como un arreglo lineal de alelos en una cadena simple de 16S ADN_r). Esta definición de cepa es contradictoria con la definición de cepa bacteriana, la cual es un cultivo puro. Cuando en una cepa solo hay un haplotipo 16S, la población de rotíferos es llamada “**Clon o cepa clonal de rotíferos**”. Por otro lado, Un “**linaje**” o “**biotipo**” es un grupo de cepas de rotíferos relacionados entre si en un árbol filogenético

2.5 Sistemática y filogenia del complejo *Brachionus plicatilis*.

A pesar de haber evolucionado independientemente durante un periodo de tiempo significativo, este grupo de rotíferos presenta poca variabilidad morfológica, esto apoya la hipótesis que la Estasis Morfológica es una característica común en este grupo, que se dispersa de una manera pasiva. Las diferencias morfológicas encontradas son sutiles, y la detección de especies solo fue posible cuando se cultivaron individuos a las mismas condiciones en laboratorio y cuando cohortes de la misma edad fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido y aplicando herramientas estadísticas biométricas (Análisis Discriminante). Las muestras de rotíferos colectadas en campo son frecuentemente imposibles de discriminar por especies (Gómez *et al.*, 2002 b).

La sistemática referente a *Brachionus plicatilis* ha cambiado mucho en estos últimos años desde que se descubrió que se trataba de un complejo de especies crípticas (Dos o mas distintas especies que fueron clasificadas erróneamente o están escondidas bajo un mismo nombre de especie). Otras líneas de investigación sugieren que este taxa de rotíferos esta compuesto, en realidad, por “clusters” de especies hermanas o crípticas (Gómez *et al.*, 1995,

Gómez & Snell 1996, Serra *et al.*, 1998, Gómez *et al.* 2000), y que por lo tanto no se trata de solo una especie cosmopolita adaptada a vivir en amplios rangos de salinidad y temperatura como se creía hasta hace pocos años (Suatoni *et al.*, 2006).

2.5.1 Uso de Análisis Multivariado en la Sistemática del complejo *Brachionus plicatilis*.

Métodos estadísticos multivariados han sido empleados en varios grupos de organismos como por ejemplo en el complejo de especies de *Artemia* (Camargo *et al.*, 2003; Baxevanis *et al.*, 2005; Mura *et al.*, 2006). Estos procedimientos estadísticos fueron empleados para poder caracterizar especies imposibles de describir por métodos tradicionales, construyendo una matriz de datos con especies previamente bien caracterizadas morfométricamente. Con esta matriz se pudo clasificar muestras de origen desconocido o de taxonomía problemática. Los métodos multivariados también han sido utilizados en rotíferos (Fu *et al.*, 1991 a; Hagiwara *et al.*; 1995; Ciro-Pérez *et al.*, 2001; Campillo *et al.*, 2005) para poder diferenciar cepas con respecto a su morfología, especialmente relacionado con el tamaño y la forma de las espinas anteriores de la lórica. Estos métodos estadísticos se han utilizado paralelamente con análisis moleculares, ya sea isozimas o marcadores moleculares observándose concordancia entre sus resultados (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

El análisis multivariado más utilizado para los fines anteriormente mencionados, es el análisis discriminante, que consiste en calcular una serie de variables nuevas (Z_1, Z_2, \dots), las cuales son funciones lineales de los parámetros morfológicos considerados con la forma $Z_n = I_1 X_1 + I_2 X_2 + \dots$ (Donde I_n son los coeficientes discriminantes calculados y X_s las variables consideradas). La función discriminante es construida de tal manera que la mayor cantidad de miembros de una población tengan valores altos de Z y que la mayor cantidad de miembros de otra población tengan valores bajos de la misma, de tal manera que Z sirva como un mayor discriminante que las variables X_1 y X_2 consideradas solas (Triantaphyllidis *et al.*, 1997).

Fu *et al.* (1991a) realizaron la primera caracterización morfométrica de cepas de rotíferos utilizados en acuicultura mediante análisis discriminante a 67 cepas colectadas u obtenidas en diversas instituciones acuícolas del Japón y del

mundo. Este fue el primer trabajo que utilizó análisis estadístico multivariado sobre las variaciones morfológicas para diferenciar las dos cepas de rotíferos *Brachionus plicatilis*, descartando las variables ambientales como salinidad y temperatura que hubieran podido influir en la variación de forma y tamaño, ya que se creía que estos parámetros eran la causa de variación morfológica. De los resultados se concluye que es posible clasificar a las dos cepas, “L” (Large) y “S” (Small), utilizando análisis discriminante y que las variaciones en su morfología se deberían a diferencias genéticas.

Las mismas cepas de rotíferos que fueron estudiadas morfológicamente por Fu *et al.* (1991a), estas fueron analizadas mediante electroforesis de proteínas (Aloenzimas) para conocer las divergencias genéticas entre las cepas “L” y “S”. Estas cepas fueron agrupadas en dos grandes grupos, coincidiendo con el análisis morfométrico realizado previamente, concluyendo que estas cepas difieren genéticamente (Fu *et al.*, 1991b).

Entre 1987-1989, tres cepas de rotíferos de tamaño muy pequeño fueron colectadas en Japón para ser utilizadas en acuicultura, debido a su tamaño fueron llamadas cepas “SS” de “Super Small”. Se creía que podrían ser nuevas especies pero Hagiwara *et al.* (1995), al examinar las características morfológicas, modo reproductivo y patrones de aloenzimas, encontraron que estas cepas eran muy similares a *Brachionus rotundiformis* y que por lo tanto no había evidencia de que fueran nuevas especies.

Además de los anteriores descubrimientos se realizaron otros trabajos con el fin de reforzar la hipótesis de que las cepas “L” y “S” eran en realidad dos especies bien definidas, para lo cual, se hicieron pruebas sobre las diferencias entre la reproducción sexual y asexual (Hirayama & Rumengan, 1993), y también se analizaron los cariotipos encontrando que la cepa “L” es $2n = 22$ y la cepa “S” es $2n = 25$ (Rumengan *et al.*, 1991), y con respecto al entrecruzamiento no se observó la formación de huevos de resistencia al cruzar las dos cepas (Fu *et al.*, 1993). Estas evidencias entre otras le permitieron a Segers (1995) separar finalmente las dos cepas en *Brachionus plicatilis* O. Müller, 1786 y *B. rotundiformis* Tschugunoff, 1921 para las cepas Tipo-L (Large) y Tipo-S (Small), respectivamente.

2.5.2 Uso de Marcadores Moleculares en Rotíferos.

Técnicas moleculares tales como procedimientos de extracción de ADN, amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con “primers” conservados, marcadores moleculares como el COI (Citocromo C oxidasa I) (Gómez *et al.*, 2000; 2002), genes del 16S ribosómico (Derry *et al.*, 2003) y el gen nuclear ITS1 (Internal Transcriber spacer I) (Gómez *et al.*, 2002) han sido utilizados para estudios de filogeografía y filogenia en rotíferos.

El ADN mitocondrial (ADNm) ha sido utilizado como marcador molecular en rotíferos, mediante el cual, es posible detectar suficiente variación en escala regional o local cuando se analizan genes de evolución rápida (Gómez, 2005). La heredabilidad del ADNm es predominantemente materna y las secuencias del mismo reflejan más un linaje que una relación genómica. Además, puesto que las moléculas de ADNm ocurren en 1000 a 10 000 copias por célula, son fáciles de aislar. Por estas razones es ampliamente utilizado como marcador molecular en análisis filogenéticos intra e interespecies (Kocher *et al.*, 1989).

El análisis de los loci de microsatélites también ha sido utilizado por Gómez *et al.*, (1998), para estudios de estructura poblacional y clonal en rotíferos, pero la gran limitante de este análisis es la disponibilidad de los “primers” que tienen que ser elaborados (siguiendo protocolos largos) especialmente para cada especie. Estos han sido desarrollados solo para *Brachionus plicatilis* s. s., pero desafortunadamente, han fracasado en la amplificación cruzada e incluso en otras especies de este complejo (Gómez, 2005).

2.5.3 Sistemática y filogenia mediante el uso de marcadores moleculares en el Complejo *Brachionus plicatilis*.

Desde que Segers (1995) propuso el uso de *B. plicatilis* Müller 1786 y *B. rotundiformis* Tschugunoff, 1921, como la designación correcta para los morfotipos “L” y “S”, respectivamente, la mayoría de investigadores han utilizado estos nombres para denominar sus propias cepas asumiendo que estos taxa son cosmopolitas, a pesar de existir ya evidencia de un complejo de especies (Ciros-Pérez *et al.*, 2001).

En Torreblanca Sur (España), donde se presentan varios cuerpos de agua salobres, se encontraron 3 grupos clonales genéticamente distintos en base al análisis de aloenzimas, a las características en tamaño y a la forma del cuerpo, los denominaron cepas SS (cepas de menor tamaño), SM (médium) y L (cepas de mayor tamaño), estos grupos clonales se suceden en un mismo cuerpo de agua dependiendo de las estaciones, con algunos traslapamientos, pero a pesar de esto, la ausencia de heterozigosis encontrada indicaría que el flujo génico entre las cepas esta fuertemente restringido (Gómez *et al.* 1995).

Además, Gómez & Snell (1996) analizaron la morfometría de 9 cepas de rotíferos de varias partes del mundo, 5 de *Brachionus plicatilis* y 4 de *B. rotundiformis*, dichas cepas formaron dos grupos, sin embargo, según el análisis cluster con las distancias génicas obtenidas por análisis de aloenzimas, y los patrones de apareamiento, se determinó que, por lo menos existen 3 grupos de especies crípticas.

Ciros-Pérez *et al.* (2001) presentaron un análisis morfométrico comparativo de las 8 cepas que formaron los 3 grupos de cepas en Gómez *et al.* (1995), como *Brachionus plicatilis* (Clones L1, L2, L4), *Brachionus rotundiformis* SM (SM2, SM5 y SM11) y *Brachionus rotundiformis* SS (SS2 y SHON), agrupados de acuerdo a su genotipo. Los resultados de la agrupación por morfometría coincidieron con la agrupación genética establecida. Así ellos llegan a la conclusión que, trabajos detallados en la morfología y morfometría de rotíferos revelan caracteres taxonómicos constantes, suficientes para reconocer morfologías bien definidas, las cuales, siempre corresponden con la especie biológica determinada. Además, reportan una nueva especie (*Brachionus ibericus*), cuyo holotipo fue tomado de la cepa SM2, que es mantenida en la colección de rotíferos del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biología Evolutiva, de la Universidad de Valencia-(ICBIBE-UV), España. Asimismo, debido a la ausencia de los holotipos de *B. plicatilis* y *B. rotundiformis*, ambas especies han sido redescritas a partir de cepas españolas. Los neotipos, al igual que los holotipos de *B. ibericus*, han sido depositados en el Museo de Historia Natural de Londres (Inglaterra) para permitir futuras investigaciones que puedan aclarar el status de estas especies.

Gómez *et al.*, (2002), investigaron la filogenia molecular del complejo *B. plicatilis* utilizando la variación de la secuencia del nucleótido para genes nucleares y mitocondriales, los cuales fueron el ITS1 de "Ribosomal internal

transcribed spacer” y el COI de “Cytochrome C oxidase subunit I”, respectivamente, utilizando huevos de resistencia provenientes de 27 lagos salados de la península ibérica y además muestras de lagos de los cuatro continentes. Ellos encontraron que este complejo esta conformado por 9 linajes genéticamente divergentes que son: *Brachionus plicatilis* s. s., *B. ibericus*, *B. rotundiformis*, *Brachionus* sp. CAYMAN, *Brachionus* sp. NEVADA, *Brachionus* sp. AUSTRIA, *Brachionus* sp. MANJAVACAS, *Brachionus* sp. TISCAR y *Brachionus* sp. ALMENARA. De estos, solo 3 linajes han sido descritos: *B. plicatilis* s. s., *B. ibericus*, y *B. rotundiformis*. Finalmente, Suatoni et al. (2006) afirman que este complejo de especies crípticas estaría compuesto de un mínimo de 7 y posiblemente hasta más de 14 especies, que es la más alta estimación para este grupo hasta el momento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Breve descripción de los lugares de colecta y procedencia de las cepas.

3.1.1 Albufera de Bocapán: ($03^{\circ} 42' S$ y $80^{\circ} 41' W$). Ubicada en el Departamento de Tumbes, provincia Contralmirante Villar, distrito de Zorritos. Es una zona de estuario donde desemboca el río Bocapán, los lugares muestreados fueron a ambos lados del puente Bocapán de la carretera Panamericana Norte (Fig. 8). En las cercanías de este lugar se observa cuerpos de agua de regular tamaño y son semi permanentes. El área de muestreo se llega a secar completamente durante las épocas de como otoño e invierno, quedando una laguna permanente en el área cercana a la costa. La salinidad del agua en el momento de muestreo fue de 62 g.L^{-1} .



Fig. 8. Cuerpo de agua temporal en la desembocadura del río Bocapán, distrito de Bocapán, Provincia de Contralmirante Villar, Departamento de Tumbes.

3.1.2 Humedales de Ventanilla (11°52' 17.9'' S y 77° 08' 19.7'' W).

Ubicada en el departamento de Lima, Provincia Constitucional del Callao, distrito de Ventanilla. Se muestreó en la laguna llamada “El Mirador”. La cual está formada por los afloramientos de agua dulce proveniente de la cuenca del río Chillón. Se encuentra a pocos kilómetros del mar, y el ambiente esta relacionado con una zona salina de origen talasohalino y mixohalino (Rojas, 1975 citado por Quesquén, 1996). La laguna del mirador es permanente con fluctuaciones en el volumen de agua disminuyendo en invierno y primavera (Fig. 9).

3.1.3 Laguna de Chilca (La Mellicera). (12° 32' 35'' S, 76° 43' 31'' W).

Esta laguna esta ubicada al nor-este de las salinas de Chilca (Provincia de Cañete- Departamento de Lima). Es una poza natural que fue revestida de concreto para usarse como piscina para el público debido a que el fango posee propiedades medicinales (Fig 10). Se encuentra ubicada a 600 m al este del gramadal y a unos 200 m al norte del caserío de Baños de Chilca (Quesquén, 1996).

3.1.4 Humedales de Puerto Viejo: (12° 34' 55'' S, 76° 41' 57'' W) Está

localizado en la Pampa “Las Salinas”, en el departamento de Lima, provincia de Cañete, distrito de Chilca. Es un cuerpo de agua lagunar que recibe los aportes de aguas continentales subterráneas de origen fluvial corresponden a los ríos Chilca y Mala, cuyas aguas ascienden por capilaridad hasta la superficie acarreando sales minerales en época de afloramiento, creciente e inundación (fines de Abril, Mayo). En época de sequía o estiaje (Noviembre- inicios de Abril) la evaporación gradual favorece la formación de costras salinas mezcladas con una proporción elevada de arena eólica que en verano forman salitrales. (Montoya, 2004). La pequeña laguna donde se colectaron las cepas es ligeramente rectangular de aproximadamente 320 m² de superficie. (Fig. 11)



Fig. 9. Laguna El Mirador de los humedales de Ventanilla, distrito de Ventanilla, Provincia de Lima, Departamento de Lima.



Fig. 10. Laguna medicinal La Mellicera en el distrito de Chilca, provincia de Cañete.



Fig. 11. Laguna en el humedal de Puerto Viejo, Departamento de Lima, provincia de cañete, distrito de Chilca.

3.1.5 Humedales de Torreblanca: ($40^{\circ} 10' 04''$ N, $0^{\circ} 10'57''$ E), Localizado en Castellón-España. Es un área salobre, cercana a la línea costera compuesta de pequeños estanques y canales los cuales pueden inundarse de invierno a primavera. El cuerpo de agua de procedencia exacta es Poza Sur, el cual es de forma ligeramente rectangular. Sus máximas dimensiones se observan en invierno, con una longitud de 30 metros y 7 metros de ancho, la profundidad varía llegando a 1.5 m en invierno (Gómez *et al.*, 1995).

Los datos fisicoquímicos de los cuerpos de agua donde se colectaron las cepas peruanas se encuentran en la tabla 1.

TABLA 1. Datos de la procedencia y parámetros fisicoquímicos de los lugares donde se colectaron los rotíferos nativos.

	Cepa TP	Cepa VL	Cepa PVL2
Procedencia	Albufera de Bocapán, Zorritos (Tumbes, Perú)	Laguna el Mirador en los humedales de Ventanilla (Callao-Lima)	Humedales de Puerto Viejo (Lima-Perú)
Latitud	03° 42' S	11° 53' 30" S	12° 34' 55" S
Longitud	80° 41' O	77° 09' 25" O	76° 41' 57" O
Fecha	05 Abril 2004	15 Marzo 2005	18 Mayo 2006
Temperatura	30°C	24 °C	23 °C
Salinidad	62 g/L	10 g/L	16 g/L
pH	8.00	7.72	8.28
Estación del año	Otoño	Verano	Otoño

3.2 Colecta y aislamiento de cepas clonales de rotíferos nativos.

Se colectaron muestras de rotíferos planctónicos, la primera en la albufera de Bocapán, Tumbes, Perú (Fig. 8) y la segunda en la laguna “El Mirador” en los Humedales de Ventanilla, Callao (Fig. 9). La colecta se realizó mediante el filtrado el agua empleando una red de plancton de 75 µm. Las muestras fueron tomadas en 2 puntos del cuerpo de agua, cerca de la orilla, luego se trasladaron hasta el Laboratorio de Biología Experimental del IMARPE.

En el laboratorio, se iniciaron cultivos clonales a partir de una sola hembra amictica, esto se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscopio y pipetas pasteur. Cada cepa clonal fue denominada de acuerdo a su procedencia geográfica o según el nombre de la institución de procedencia. Por ejemplo, a la cepa Ventanilla se le denominó como VL, V por Ventanilla y L por el departamento de Lima. En la tabla 2 se detallan las denominaciones de cada cepa que se utilizó en este trabajo.

Las salinidades de los cultivos de rotíferos colectados fueron llevadas a 35 g/L⁻¹ en el laboratorio. La cepa de la Albufera de Bocapán (TP), fue encontrada

en aguas de salinidad elevada (62 g/L) y no se observaron copépodos, sólo el protozoario *Fabrea salina* en escaso número. En cambio, la salinidad en la que se encontró la cepa Ventanilla (VL) fue baja (10 g/L) y se encontraron abundantes copépodos y protozoarios.

Las cepas de Chilca (CHL) y Puerto Viejo (PVL1) fueron proporcionadas por Rosario Cisneros del laboratorio de Acuicultura del IMARPE, estas fueron utilizadas como alimento vivo para larvas del “Lenguado peruano” (*Paralichthys adspersus*) durante el año 2005. Un año después se colectó la cepa PVL2 en el mismo cuerpo de agua que la cepa PVL1.

3.3 Uso de las cepas introducidas y cepas patrón.

Las cepas utilizadas como patrón son cepas perteneciente a 2 especies redescritas y 1 descrita por Ciro-Pérez et al. (2001) estas son las cepas L1, SS2 y SM2, pertenecientes a las especies *Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis* y *B. ibericus*, respectivamente. Estas fueron enviadas por el Dr. Manuel Serra, y se encuentran en la colección en cultivo del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de la universidad de Valencia-España (UCBIBE-UV). Las cepas patrón se utilizarán para ver si alguna de las cepas en estudio coincide con alguna de ellas mediante el análisis multivariado discriminante.

En la tabla 2 se muestran la procedencia y/o las instituciones donde se mantienen en cultivo para los diferentes usos como la acuicultura, estudios de ecología de poblaciones, filogenia, evolución, etc.

La cepa CA, es una cepa comercial importada de los Estados Unidos por la Facultad de Pesquería de la Universidad Agraria La Molina para utilizarlo como alimento vivo en diversas pruebas experimentales de acuicultura, fue donada por el Ing. Leoncio Ruiz.

La cepa CF, es utilizada como alimento vivo en el centro de acuicultura Morro Sama del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (FONDEPES), y fue introducida desde la Universidad de Iquique, Chile, se desconoce su procedencia geográfica.

TABLA 2. Procedencia de las 8 cepas de rotíferos analizadas.

ABREVIATURA DE LA CEPA	PROCEDENCIA	INSTITUCION	ESPECIE
TP (Tumbes)	Albufera de Bocapán (Tumbes-Perú)	Laboratorio de Biología Experimental-IMARPE	<i>Brachionus</i> sp.
VL (Ventanilla)	Humedales de Ventanilla (Lima-Perú)	Laboratorio de Biología Experimental-IMARPE	<i>Brachionus</i> sp.
CHL (Chilca)	Laguna Mellicera-Chilca (Lima-Perú)	IMARPE-Lab. De Cultivos Marinos	<i>Brachionus</i> sp.
PVL1 (Puerto Viejo 1)	Humedal de Puerto Viejo (Lima-Perú)	IMARPE-Lab. De Cultivos Marinos	<i>Brachionus</i> sp.
PVL2 (Puerto Viejo 2)	Humedal de Puerto Viejo (Lima-Perú)	IMARPE- Lab. de Ecotoxicología	<i>Brachionus</i> sp.
CA (Cepa Univ. Agraria)	Cepa comercial (USA)	UNALM	<i>Brachionus</i> sp.
CF (Cepa FONDEPES)	Universidad Iquique Chile	Centro de acuicultura Morro Sama- FONDEPES	<i>Brachionus</i> sp.
L1	Torre Blanca Sur. (Castellón-España)	Universidad de Valencia	<i>Brachionus plicatilis</i> s. s.
SS2	Torre Blanca Sur. (Castellón-España)	Universidad de Valencia	<i>Brachionus rotundiformis</i>
SM2	Torre Blanca Sur. (Castellón-España)	Universidad de Valencia	<i>Brachionus ibericus</i>

3.4 Mantenimiento del cepario de rotíferos.

Con motivo de la realización de esta tesis se ha creado en el laboratorio de Biología Experimental del IMARPE un cepario de rotíferos, donde se mantiene en cultivo stocks tanto de las cepas colectadas en Tumbes, Ventanilla, como las donadas por otras instituciones (Tabla 1). Mantener un cepario de rotíferos identificados y de procedencia conocida es importante por que permite realizar diversas pruebas: cultivo en masa, ecotoxicología, etc.

Las cepas de rotíferos se mantienen en tubos de centrífuga tipo Falcón de fondo cónico y tapa rosca, de 50 mL., colocados en gradillas de acrílico y sumergidos en un acuario.

Las cepas de rotíferos se mantuvieron bajo las siguientes condiciones fisicoquímicas:

- a) **Temperatura:** La temperatura de cultivo se mantuvo a 25 ± 1 °C. Esta temperatura se logra utilizando un calentador con termostato de 50 Watts, el cual se sumerge en un acuario, donde a su vez se encuentran sumergidos los tubos tipo Falcon que contienen los cultivos de rotíferos.
- b) **Salinidad:** Las cepas españolas de referencia SS2, L1 y SM2 fueron mantenidas a 12 g. L^{-1} de salinidad y las cepas, TP, PVL2, VL, CA, CF a 35 g. L^{-1} , El medio utilizado se prepara con Sal marina artificial de la Marca MARINEX®, diluida en agua filtrada por osmosis inversa, y desinfectada con Luz ultravioleta y ozono. Para un litro de agua se diluye, con ayuda de un agitador magnético, 40g y 14g de la sal marina artificial para obtener el medio a la salinidad de 35 y 12 g. L^{-1} , respectivamente. Luego se verifica la salinidad utilizando un refractómetro-salinómetro de marca ATAGO y finalmente se autoclava este medio a 110°C y 15 PSI de presión por 15 minutos.
- c) **Luz:** Todas las cepas fueron mantenidas a una intensidad de luz constante de 3000 Lux (medido con un Luxómetro), la cual se logra utilizando 3 tubos fluorescentes ubicados a 30 cm del acuario donde se encuentran los rotíferos.

Paralelamente al cultivo de rotíferos se realizó:

Cultivo de la microalga *Nannochloris maculata*, Fue cultivada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y 35 g/L de salinidad, en la sala de cultivos de microalgas de la unidad de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE .

Se utilizó agua de mar artificial a 35°C y el medio de cultivo utilizado fue el f/2 de Guillard (1975) (Tabla 3). Luego de 3 o 4 días de cultivo, las

microalgas se centrifugan a 3500 rpm por 12 minutos, para ello, se utilizó una centrifuga automática HERMLE Z200A. El concentrado de microalgas se resuspende en agua de mar artificial a 12g/L. La densidad del concentrado resuspendido se calcula realizando conteos con la ayuda una cámara de Neubauer a 400 aumentos bajo un microcopio NIKON ECLIPSE E4000. Conociendo la densidad del concentrado se realizaron las diluciones respectivas para cada prueba del experimento.

TABLA 3. Concentración de fertilizantes en el medio de cultivo para las algas (medio f/2 de Guillard, 1975).

^a Se añade NH_4Cl cuando se cultivan algas que no pueden crecer con nitrato. Con frecuencia se añade a todo tipo de cultivo, con objeto de proporcionar una fuente adicional de N a las algas.

Constituyentes	Cantidad (mg)
Nutrientes principales	
NaNO_3	75
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	15-30
Oligoelementos	
$\text{Na}_2\text{.EDTA+}$	4,36
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,18
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006
Vitaminas	
Tiamina.HCl	0,1
Biotina	0,0005
B_{12}	0,0005
Enriquecimiento ^a	
NH_4Cl	26,5
Agua de mar	hasta 1 l

3.5 Condiciones fisicoquímicas para la prueba de morfometría.

Con el fin de acondicionar las cepas para el experimento según el diseño de jardín común que se explica en el diseño experimental del presente trabajo, todas las cepas fueron llevadas y mantenidas a 35 g.L⁻¹ (Esta es una salinidad de consenso y fue elegida por ser una salinidad intermedia, ya que las cepas provienen de cuerpos de agua con distintas salinidades, tabla 2) durante 1 mes antes de iniciar el experimento. La temperatura del medio se mantuvo a 25 °C ± 1°C y los rotíferos fueron alimentados con microalgas (*Nannochloris maculata*) a una densidad de 15 millones de células. mL⁻¹.

Las cepas españolas L1, SS2 y SM2 fueron mantenidas en el cepario a 12 g/L, por lo que se tuvo que incrementar la salinidad gradualmente, lo cual se logró aumentando diariamente el volumen del tubo con el alimento suministrado (microalgas a 35 g/L) durante una semana.

3.6 Diseño Experimental para la caracterización morfométrica.

El diseño experimental del **Jardín Común** se basa en criar a todos los individuos bajo las mismas condiciones de temperatura, salinidad, luz, etc., con el fin de minimizar los factores que pudieran estar interfiriendo en la respuesta del parámetro o carácter que se quiere medir. De tal manera que cualquier variación o diferencia morfológica que se encuentre entre las cepas pueda atribuirse únicamente a su genotipo (Fu, et al.1991a).

Las cepas utilizadas para este análisis fueron: L1, SS2, SM2, TP, CA, PVL2, VL Y CF. Los datos de la procedencia geográfica de estas cepas se encuentran especificados en la tabla 1. Se midieron alrededor de 30 individuos de la misma edad biológica, es decir, hembras que carguen su primer huevo amictico (con excepción de SM2, cepa de la cual solo se midieron 20 individuos). Para obtener rotíferos recién eclosionados se utilizaron, por cepa, dos placas multi-excavadas con 6 pocillos de 5 mL de capacidad, donde se colocaron 10 hembras que cargaban huevos amicticos (escogidas al azar de un cultivo de crecimiento exponencial) con 1 mL de medio de cultivo con 5 millones de células/mL de *Nannochloris maculata*. Después de 3 horas a más dependiendo de la cepa, los rotíferos recién eclosionados fueron colocados individualmente en

cámaras de cultivo celular de 48 pocillos, de 2 mL de capacidad cada uno, con 1 mL de medio de cultivo. Cuando los rotíferos cargaron su primer huevo fueron fijados con formaldehído al 4% (concentración final). Las mediciones se realizaron con ayuda del ocular micrométrico del microscopio Nikon Eclipse E400 a 40X. Se midieron 9 caracteres morfométricos por cada individuo, según Fu *et al.* (1991a) se midieron los caracteres A, B, C, D, E, F y G (Fig. 12) y según Ciro-Pérez *et al.* (2001) los caracteres A, C, D, E, G, H, I (Fig. 12).

Donde:

- A = Longitud de la lóricas.
- B = Distancia entre las 2 espinas 3.
- C = Ancho de la lóricas.
- D = Distancia entre las espinas internas 1
- E = Profundidad del seno dorsal.
- F = Distancia entre las espinas 1 y 2.
- G = Longitud del borde interno de la espina 2.
- H = Longitud de la espina 3.
- I = Apertura interior de la lóricas.

3.7 Análisis Multivariado y Estadístico.

Los resultados de la caracterización morfométrica fueron evaluados mediante un análisis multivariante discriminante por pasos (Step-wise), cada entrada o remoción de una variable es considerado un paso, aplicando el criterio de minimizar el Lambda de Wilks.

Se utilizó el programa estadístico SPSS® versión 13 para WINDOWS®, los datos fueron previamente transformados aplicándoles logaritmo (Ln). Se agruparon y analizaron los datos de dos formas, la primera según Fu *et al.* (1991a), se analizaron los caracteres A-G, y en la segunda se utilizaron los caracteres A, C, D, E, G - I, según Ciro-Pérez *et al.* (2001), con el objetivo de observar diferencias en el poder discriminatorio.

En base a los resultados del análisis discriminante se agruparon las cepas para realizar Análisis de Varianzas entre proporciones de los caracteres medidos, de la siguiente manera: La cepa SS2 corresponde a la especie *Brachionus rotundiformis*, la cepa SM2 a la especie *B. ibericus*, las cepas L1 y CA corresponden según este análisis a la especie *B. plicatilis* y las cepas peruanas TP, PVL2, VL, más la cepa introducida CF se las agrupó en *Brachionus* sp. Las proporciones fueron las siguientes: Log A: Logaritmo de la longitud de la lóricas, C/A: Forma relativa de lóricas, B/C: Proporción entre la apertura anterior del lóricas

y el ancho de la lórica, H/A: Tamaño relativo de la espina izquierda 3, I/A: Apertura anterior relativa de la lórica, G/H: la relación entre la longitud de la espina 2 con la espina 3 (Fig. 9). Se analizaron las proporciones mediante un análisis de varianza (ANOVA)-Student Newman Keuls ($p < 0.05$) (Sokal y Rohlf, 1981). Se realizó previamente la verificación de la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnoff (Sokal & Rohlf, 1981) y la prueba de homogeneidad de varianzas según el test de Levene (Norusis, 1993).

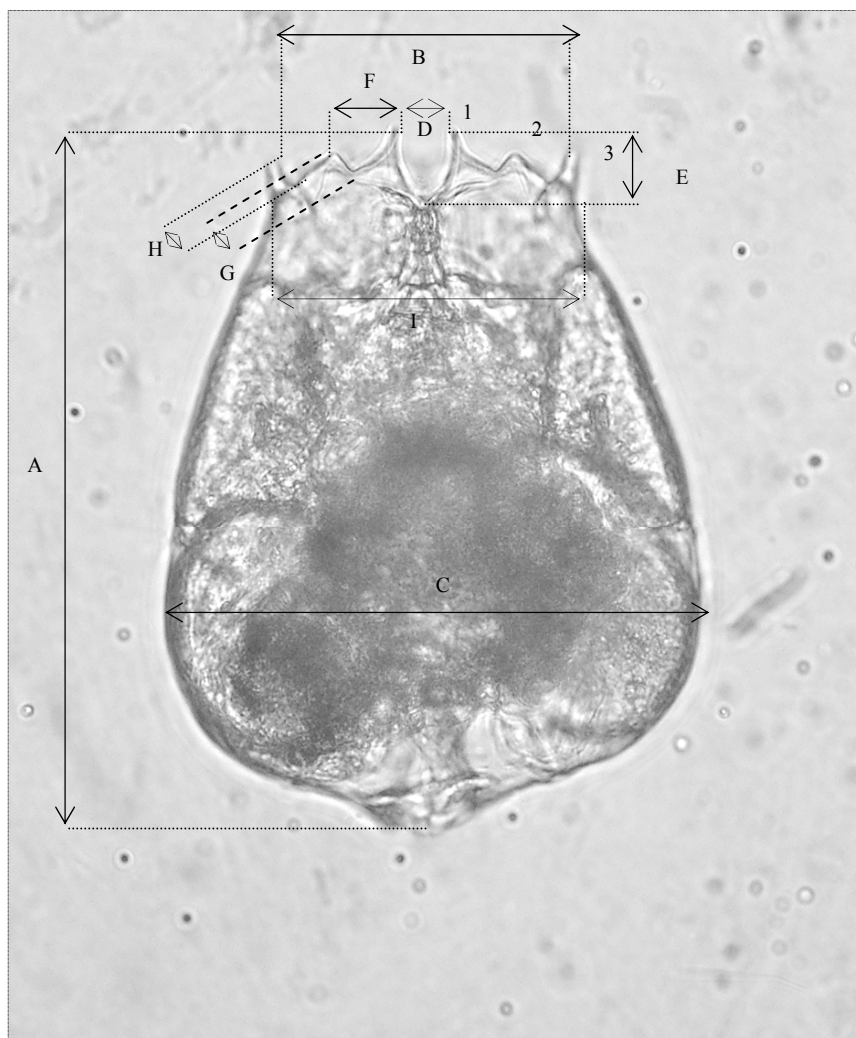


Fig. 12.-Caracteres morfométricos de la lóric de *Brachionus* sp. (Cepa PVL2)

Donde:

- A = Longitud de la lóric.
- B = Distancia entre las 2 espinas 3.
- C = Ancho de la lóric.
- D = Distancia entre las espinas internas 1
- E = Profundidad del seno dorsal.
- F = Distancia entre las espinas 1 y 2.
- G = Longitud del borde interno de la espina 2.
- H = Longitud de la espina 3.
- I = Abertura anterior de la lóric.

3.8 Caracterización filogenético.

Seis cepas clonales mantenidas en el cepario de rotíferos fueron fijadas con etanol absoluto y enviadas al Laboratorio de “Molecular Ecology and Evolution” de la Universidad de Hull, para ser analizadas genéticamente según la técnica propuesta por Gómez *et al.* (2002), utilizando el marcador genético COI. Estas cepas fueron L1, SS2, CA, VL, PVL1, y CHL. Las dos últimas cepas analizadas, PVL1 y CHL, son cepas que fueron utilizadas como alimento vivo en La Unidad de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE durante el año 2005. La cepa PVL1 fue colectada en el Humedal de Puerto Viejo en la misma laguna que PVL2 pero en distintas fechas, y la cepa CHL en la laguna “La Mellicera” en Chilca, ambos en la provincia de Cañete, al sur de Lima. Posteriormente, la Dra. África Gómez envió las secuencias para dicho marcador como de las cepas de los demás linajes, para poder construir los árboles filogenéticos correspondientes.

3.8.1 Construcción de los árboles filogenéticos.

El objetivo de emplear árboles filogenéticos o cladogramas fue el de comparar los resultados obtenidos por morfometría con el análisis filogenético para verificar hasta que nivel nos permite discriminar las cepas.

Para la construcción de los cladogramas se trabajó sobre la base de las secuencias enviadas por la Dra. África Gómez, utilizándose las secuencias de los genes para el marcador molecular COI, se construyeron 2 cladogramas, en el primero solo se consideraron las secuencias de las cepas enviadas utilizando la cepa *Brachionus quadridentatus* bp4PET21 como “outgroup”, esto con el fin de conocer las relaciones filogenéticas entre las cepas peruanas y las cepas de referencia que ya son especies conocidas. Para el segundo cladograma se agregaron las secuencias de las cepas de rotíferos de los linajes “Almenara” (secuencia 6ALM32 COI), “Cayman” (secuencia *Brachionus* sp. Cayman Cayman1 COI), “Austria” (secuencia *Brachionus* sp. Austria Austria L COI), “Nevada” (secuencia *Brachionus* sp. Nevada L COI) y la especie *Brachionus ibericus* (secuencia *Brachionus ibericus* 6ALMSM5 COI), “Manjavacas” (secuencia *Brachionus* sp. Manjavacas MANL5 COI), “Tiscar” (secuencia *Brachionus* sp. Tiscar % TIS1 COI) como referencia, este segundo cladograma fue construido

para averiguar la posición filogenética de las cepas peruanas con respecto a los demás linajes ya descritos, además de las especies de referencia.

Las distancias genéticas fueron calculadas con el modelo Log Det (Tamura–Kumar) y el cladograma utilizando el modelo Neighbor Joining, para esto se utilizó el programa MEGA versión 3.1 (Kumar et al., 2004). Se incluyó el método de re-muestreo Bootstrap para ambos casos con una repetición de 1000 veces, esto para estimar la fiabilidad de los árboles filogenéticos.

4. RESULTADOS

4.1 Breve descripción de las cepas en estudio.

4.1.1 Cepa nativa VL (Fig. 13 b)

Procedencia: La muestra de la cual fue aislada esta cepa clonal procede de la laguna “El Mirador”, ubicada en el departamento de Lima, Provincia Constitucional del Callao, distrito de Ventanilla. (Fig. 9). La temperatura del agua en el momento de muestreo fue de 24°C, la salinidad de 10 g/L y el pH de 7.72 (Tabla 1). En la misma muestra se encontraron abundantes copépodos y protozoarios.

Material examinado: Se midieron 28 hembras amicticas de la misma cohorte, que portaban su primer huevo.

Medidas: (Rango y, entre paréntesis, media \pm error estándar en μm) de espécimen hembra partenogenética adulta (23 ± 3 horas) cultivada a 25°C de temperatura y 35 g/L de salinidad. Longitud de la lórica, 180 - 215.0 (195.09 ± 1.43); Ancho de la lórica, 132.5 – 160 (143.57 ± 1.28); Abertura de la cabeza 75-90 (82.14 ± 0.67); Profundidad del sinus dorsal, 20.0-22.5 (21.2 ± 0.25); Longitud de la espina dorsal anterior 2 (Media) 7.5-10.0 (8.21 ± 0.21); Longitud de la espina dorsal 3 (Externa), 10.0-17.5 (13.12 ± 0.35).

Descripción morfológica: Hembra partenogénica con lórica flexible (pero no tan delicada como la cepa SM2), de forma ovoide (Fig. 13b). Margen dorsal anterior con 3 pares de espinas triangulares, 3 en cada lado de un sinus en forma de “U”, la espina interna (Espina 1, Fig. 2) es la mas larga y tiene terminación acuminada, la espina media (Espina 2, Fig. 2) de forma triangular con base ancha; Margen anterior ventral con 2 pares de lóbulos separados por un sinus. Las Hembras micticas tienen cargado el huevo de resistencia en el interior de la lórica (Fig.15c) hasta que esta muere, es decir se produce solo un huevo de resistencia por cada hembra mictica, esto es también característico de *B. ibericus*, y es una manera de diferenciarlo de *B. plicatilis* y *B. rotundiformis*, especies que cargan el huevo de resistencia fuera de la lórica.

4.1.2 Cepa nativa PVL2 (Fig. 13c)

Procedencia: La muestra de la cual fue aislada esta cepa clonal procede de los humedales de puerto Viejo, que esta ubicado en el departamento de Lima, provincia de Cañete, distrito de Chilca. (Fig.11). La temperatura del agua en el momento de muestreo fue de 23°C, la salinidad de 16 g/L y el pH de 8.28 (Tabla 1).

Material examinado: Se midieron 31 hembras amicticas de la misma cohorte, que portaban su primer huevo.

Medidas: (Rango y, entre paréntesis, media \pm error estadar en μm) de espécimen hembra partenogenética adulta (18 ± 3 horas) cultivada a 25°C de temperatura y 35 g/L de salinidad. Longitud de la lórica, 172.5-225 (200.8 ± 2.22); Ancho de la lórica, 140 – 175 (157.2 ± 1.5); Abertura de la cabeza, 75-110 (94.6 ± 1.25); Profundidad del sinus dorsal, 20-25 (21.93 ± 0.3); Longitud de la espina dorsal anterior 2 (Media) 7.5-12.5 (10.32 ± 0.22); Longitud de la espina dorsal 3 (Externa), 12.0-17.5 (15.16 ± 0.3).

Descripción morfológica: Las características morfológicas son similares a la descrita para la cepa VL. Las hembra micticas, tambien cargan el huevo de resistencia el interior de la lórica (Fig.15b) hasta que la hembra muere.

4.1.3 Cepa nativa TP (Fig. 14a)

Procedencia: La muestra de la cual fue aislada esta cepa clonal procede de la albufera de Bocapán, que esta ubicada en el Departamento de Tumbes, provincia Contralmirante Villar, distrito de Zorritos (Fig.8). La temperatura del agua en el momento de muestreo fue de 30°C, la salinidad de 62 g/L y el pH de 8.00 (Tabla 1). En la muestra no se encontraron copépodos, solo el protozoario *Fabrea salina*.

Material examinado: Se midieron 30 hembras amicticas de la misma cohorte, que portaban su primer huevo.

Medidas: (Rango y, entre paréntesis, media \pm error estadar en μm) de espécimen hembra partenogenética adulta (14 ± 3 horas) cultivada a 25°C de temperatura y 35 g/L de salinidad. Longitud de la lórica, 190-212.5 (203.3 ± 1.17);

Ancho de la lórica, 150 – 162.5 (155.83 ± 0.78); Abertura de la cabeza, 85-100 (90.75 ± 0.87); Profundidad del sinus dorsal, 20-25 (21.93 ± 0.3); Longitud de la espina dorsal anterior 2 (Media) 7.5-12.5 (9.5 ± 0.22); Longitud de la espina dorsal 3 (Externa), 12.0-17.5 (13.75 ± 0.31).

Descripción morfológica: Las características morfológicas son similares a la descrita para la cepa VL. Las hembra micticas, tambien cargan el huevo de resistencia el interior de la lórica (Fig.15a) hasta que la hembra muere.

4.1.4 Cepa introducida CA (Fig. 14a)

Procedencia: La muestra de la cual fue aislada esta cepa clonal es una cepa comercial procedente de USA, y es utilizada para investigación en la Universidad Nacional Agraria “La Molina”.

Material examinado: Se midieron 28 hembras amicticas de la misma cohorte, que portaban su primer huevo.

Medidas: (Rango y, entre paréntesis, media \pm error estadar en μm) de espécimen hembra partenogenética adulta (39 ± 3 horas) cultivada a 25°C de temperatura y 35 g/L de salinidad. Longitud de la lórica, 247.5-290 (270.3 ± 2.20); Ancho de la lórica, 170 – 195 (182.1 ± 1.16); Abertura de la cabeza, 110-132.5 (118.5 ± 1.14); Profundidad del sinus dorsal, 22.0-27.5 (25.8 ± 0.29); Longitud de la espina dorsal anterior 2 (Media) 12.5-15.0 (9.5 ± 0.22); Longitud de la espina dorsal 3 (Externa), 12.5-20.0 (16.2 ± 0.37).

Descripción morfológica: Las características morfológicas corresponde a la re-descripción de la especie *Brachionus plicatilis* realizada por Ciro-Pérez et al. (2001).

4.1.5 Cepa introducida CF (Fig. 13d)

Procedencia: La muestra de la cual fue aislada esta cepa clonal es una cepa de origen geográfico desconocido, fue introducida desde Chile al Perú por el Centro Acuícola de Morro Sama del Fondo nacional Pesquero (FONDEPES).

Material examinado: Se midieron 30 hembras amicticas de la misma cohorte, que portaban su primer huevo.

Medidas: (Rango y, entre paréntesis, media \pm error estándar en μm) de espécimen hembra partenogenética adulta (15 ± 3 horas) cultivada a 25°C de temperatura y 35 g/L de salinidad. Longitud de la lórica, 187.5-217.5 (200.7 ± 1.45); Ancho de la lórica, 140 – 157 (149.4 ± 0.61); Abertura de la cabeza, 80-95 (88.4 ± 0.55); Profundidad del sinus dorsal, 20-25 (21.8 ± 0.24); Longitud de la espina dorsal anterior 2 (Media) 7.5-10.0 (9.67 ± 0.28); Longitud de la espina dorsal 3 (Externa), 10.0-17.5 (13.7 ± 0.29).

Descripción morfológica: Las características morfológicas son similares a la descrita para la cepa VL. Las hembras micticas, también cargan el huevo de resistencia el interior de la lórica (Fig.15) hasta que la hembra muere.

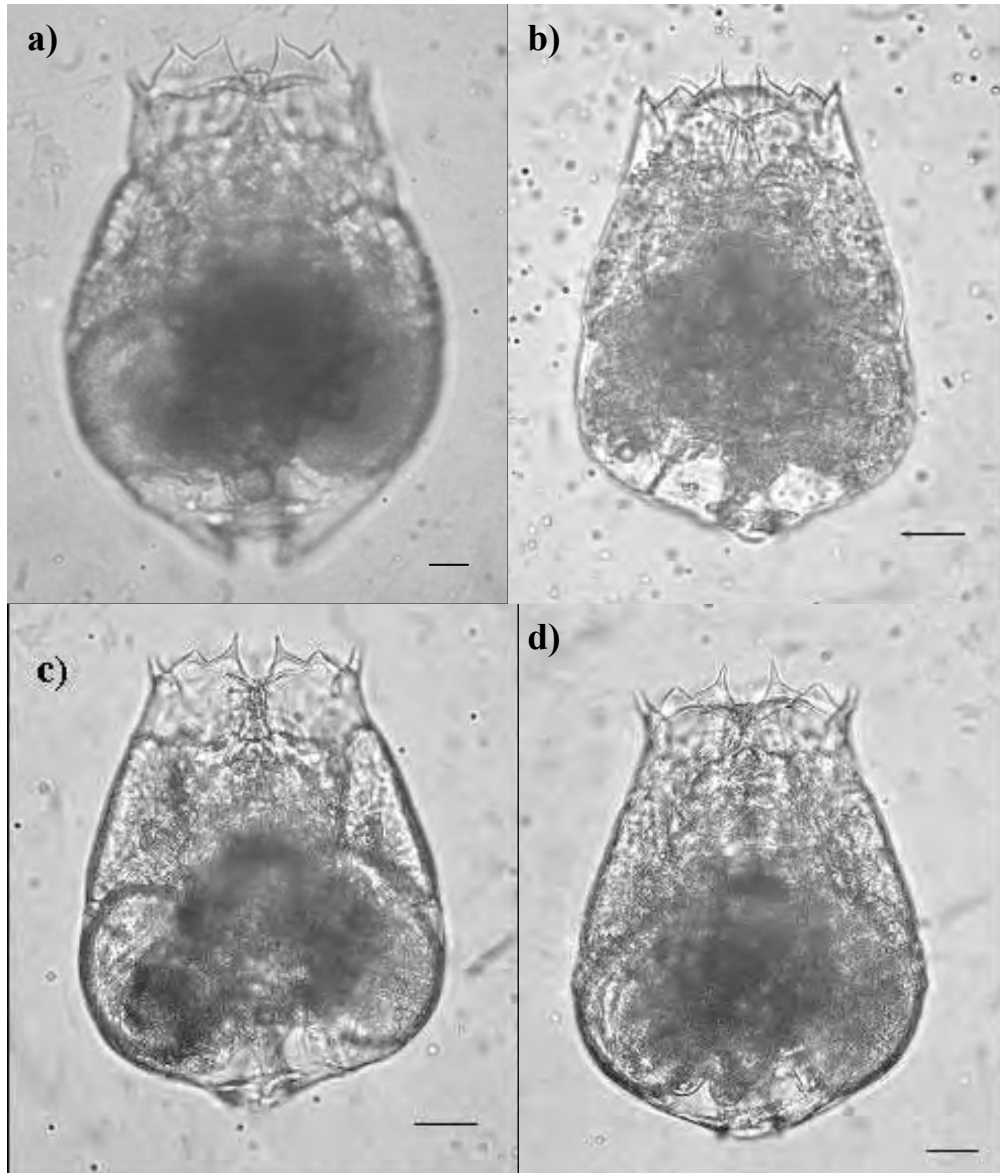


Fig. 13. Hembras amícticas o partenogenéticas de las cepas: a) CA (U. Agraria La Molina), b) VL (Ventanilla), c) PVL2 (Puerto Viejo 2), d) CF (FONDEPES). La barra representa 25 μ m.

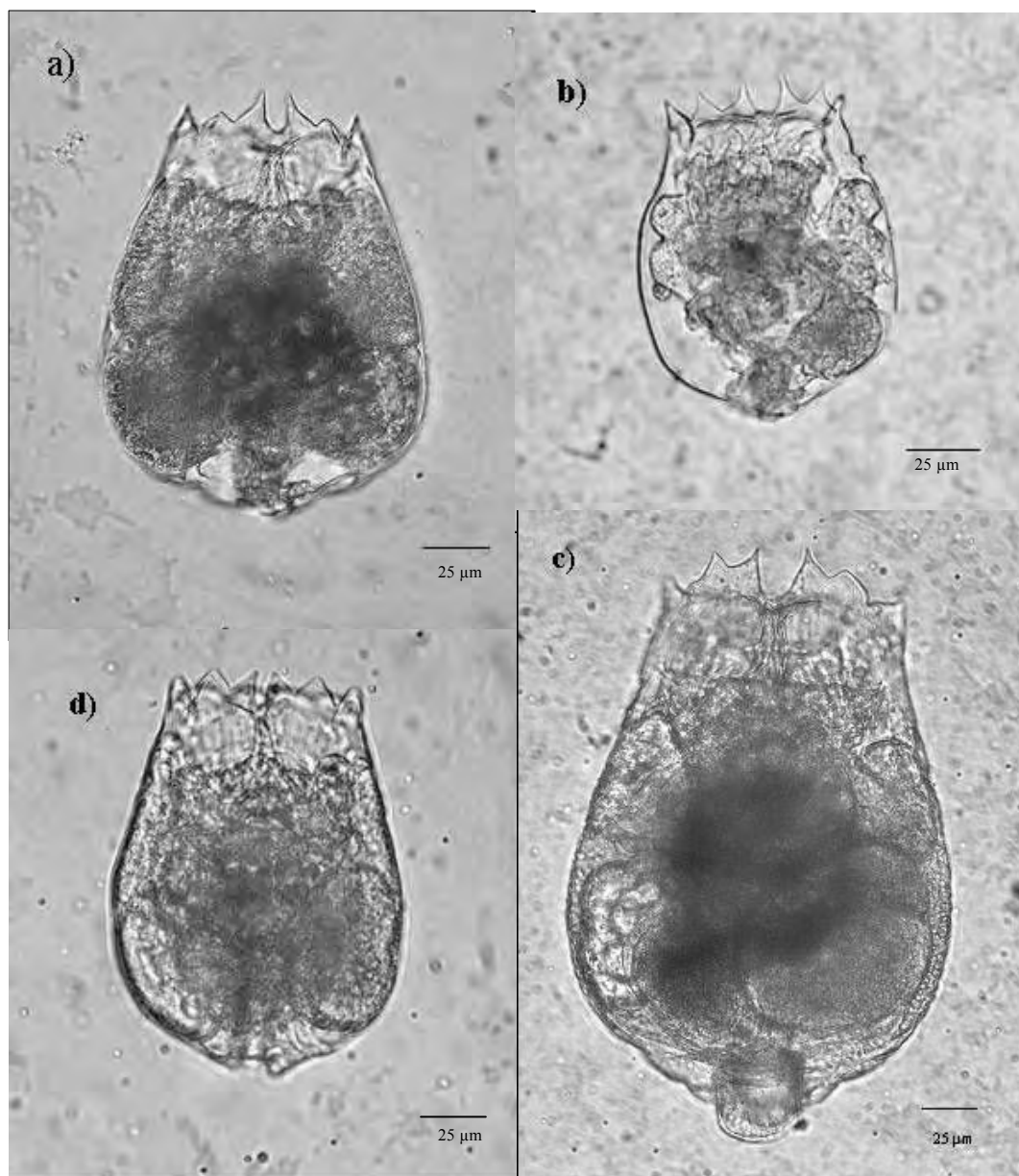


Fig. 14. Hembras amícticas de las cepas o especies: a) TP (Tumbes), b) SS2 (*B. rotundiformis*), c) L1 (*B. plicatilis*), d) SM2 (*B. ibericus*).

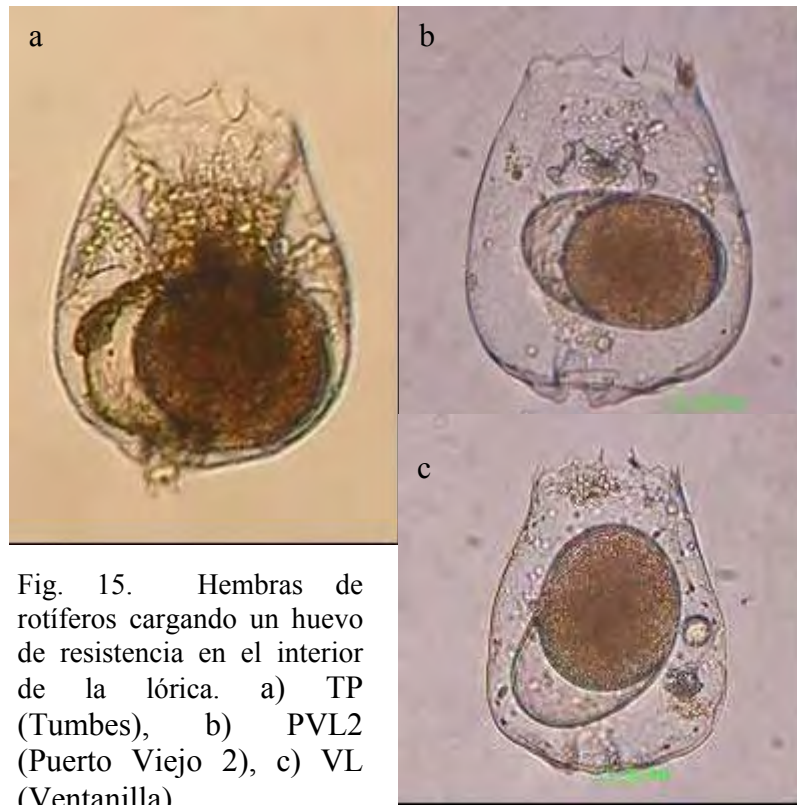


Fig. 15. Hembras de rotíferos cargando un huevo de resistencia en el interior de la lórica. a) TP (Tumbes), b) PVL2 (Puerto Viejo 2), c) VL (Ventanilla).

4.2 Morfometría

Las medidas morfométricas de cada carácter para las cepas de rotíferos se encuentran en la tabla 4. En los resultados se observa que las cepas nativas (TP, VL, PVL2) tuvieron una longitud de lórica entre de 195 a 203 μm , la cepa CA tuvo una media de 270.4 μm , la cepa CF de 200.7 μm y las cepas españolas *Brachionus plicatilis* s.s., *B. rotundiformis* y *B. ibericus* tuvieron una media de longitud de lórica de 253.2, 162.2, y 146.9 μm , respectivamente.

TABLA 4. Medias (arriba) y desviaciones estándar (abajo) para cada carácter por cada cepa de rotíferos, todas las medidas estan expresadas en micras (μm). A = Longitud de la lórica, B = Distancia entre las 2 espinas 3, C = Ancho de la lórica, D = Distancia entre las espinas internas 1, E = Profundidad del seno dorsal, F = Distancia entre las espinas 1 y 2, G = Longitud del borde interno de la espina 2, H = Longitud de la espina 3, I = Apertura interior de la lórica.

CARACTERES	CEPAS NATIVAS			CEPAS INTRODUCIDAS		CEPAS ESPAÑOLAS		
	TP (Tumbes) (n=30)	VL (Ventan.) (n=28)	PVL2 (Pto. Viejo) (n=31)	CA (U. Agraria) (n=28)	CF (FONDE- PES) (n=30)	L1 (B. plicatilis) (n=25)	SS2 (B. rotundi- formis) (n=26)	SM2 (B. ibericus) (n=20)
A	203.25	195.09	200.89	270.36	200.67	253.2	162.21	146.87
	6.44	7.59	12.72	11.68	7.96	15.21	8.98	6.97
B	84.00	75.00	91.93	120.71	92.58	123.9	83.08	67.87
	4.76	3.85	5.69	5.56	3.85	7.87	6.14	3.27
C	155.83	143.57	157.18	182.14	149.42	173.2	119.33	150.00
	4.27	6.82	8.36	6.15	3.39	8.73	5.85	8.15
D	14.67	15.45	15.56	25.98	21.50	25.5	16.54	12.12
	2.43	2.26	2.64	2.29	1.55	2.50	1.74	2.33
E	22.17	21.25	21.93	25.80	21.83	23.9	19.04	13.00
	1.83	1.27	1.67	1.53	1.30	2.40	2.35	1.54
F	21.33	19.28	21.53	25.98	22.42	25.7	21.15	48.37
	1.82	1.50	2.20	2.08	1.22	2.65	2.37	1.68
G	9.50	8.21	10.32	13.75	9.67	12.1	13.17	11.50
	1.21	1.15	1.25	1.27	0.86	1.72	1.67	1.88
H	13.75	13.12	15.16	16.25	13.67	14.6	15.19	10.62
	1.70	1.88	1.70	1.98	1.57	3.12	1.57	1.79
I	90.75	82.14	94.60	118.48	88.42	121.0	75.48	72.12
	4.79	3.58	6.98	6.06	3.04	10.08	4.06	4.82

En las tablas 5 y 8 se muestran los resultados del análisis discriminante usando el método de inclusión por pasos, el análisis discriminante I presentó el 75.5% de varianza acumulada en la primera función y el análisis discriminante II presentó el 78.8 %.

TABLA 5. Resultado del Análisis I, análisis discriminante por el método de inclusión por pasos de los caracteres A_G (según Fu et al, 1991) medidos para las cepas de Brachionus. En la tabla solo se muestran los valores de las 2 primeras funciones. (Coef. es el coeficiente estandarizado para la función discriminante canónica y Corr. es el r, el coeficiente de correlación entre grupos entre las medidas de la lógica y la función discriminante canónica).

	FUNCION 1		FUNCION 2	
	Coef.	Corr.	Coef.	Corr.
Ln(A)	0.523	0.793 (*)	-0.109	0.004
Ln(B)	0.321	0.668 (*)	0.745	0.632
Ln(C)	0.225	0.741 (*)	-0.533	-0.295
Ln(D)	0.212	0.345	0.094	0.349
Ln(E)	0.359	0.404	-0.196	-0.186
Ln(G)	-0.258	0.056	0.536	0.566
Eigenvalue	21.963		4.812	
%varianza	75.5		16.5	

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function					
	1	2	3	4	5	6
Ln_A	.523	-.109	.933	-.675	.249	-.426
Ln_B	.321	.745	-.534	.185	-.393	-.519
Ln_C	.225	-.533	-.846	.004	-.228	.847
Ln_D	.212	.094	.618	.523	-.158	.620
Ln_E	.359	-.196	.103	.609	.628	-.458
Ln_G	-.258	.536	-.198	-.321	.622	.491

Structure Matrix

	Function					
	1	2	3	4	5	6
Ln_A	.793*	.004	.206	-.567	.080	.022
Ln_C	.741*	-.295	-.423	-.195	.023	.383
Ln_B	.668*	.632	-.279	.018	-.248	-.125
Ln_F ^a	.229*	.216	-.113	-.148	.153	-.070
Ln_E	.404	-.186	-.160	.505	.694*	-.199
Ln_G	.056	.566	-.132	-.229	.674*	.391
Ln_D	.345	.349	.473	.447	-.204	.542*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions

Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

a. This variable not used in the analysis.

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	21.963 ^a	75.5	75.5	.978
2	4.812 ^a	16.5	92.1	.910
3	1.025 ^a	3.5	95.6	.711
4	.846 ^a	2.9	98.5	.677
5	.365 ^a	1.3	99.8	.517
6	.072 ^a	.2	100.0	.259

a. First 6 canonical discriminant functions were used in the analysis.

4.2.1 Análisis discriminante I.

En el análisis I (Tabla 5), la función 1 discriminó las cepas de acuerdo a la longitud de la lórica (A, con un $r = 0.793$), el ancho de la lórica (C, $r = 0.741$) y la distancia entre las 2 espinas 3 (B, $r = 0.668$). La discriminación en la función 2 se debe también a B ($r = 0.632$), así como a la longitud del borde interno de la espina 2 (G, $r = 0.566$).

En la Fig. 16 Se observa una clara discriminación de las 8 cepas, observándose la formación de 4 grupos: el primero y el segundo, de izquierda a derecha, coincide con las especies *Brachionus ibericus* (SM2) y *B. rotundiformis* (SS2), que a pesar de su cercanía, tienen grupos centroides lo suficientemente separados (Tabla 6) que permiten afirmar que en realidad son 2 grupos, lo cual se confirma en la tabla de clasificación de resultados (Tabla 7), con una

discriminación de 100% entre estas especies. El tercer grupo esta conformado por las cepas TP, PVL2, VL y CF y, finalmente, el cuarto grupo esta conformado por la especie *B. plicatilis* (L1) y por la cepa CA. La probabilidad de que L1 se clasifique como tal es del 80% y que L1 se clasifique como CA es del 20%. Asimismo, la probabilidad que tiene la cepa CA de clasificarse correctamente, es del 92.9% y que se clasifique como L1, es del 7.1% (Tabla 7).

TABLA 6. Funciones de los grupos centroides.

a) ANÁLISIS 1

Functions at Group Centroids

Cepas de rotíferos	Function					
	1	2	3	4	5	6
L1	5.125	2.122	-.447	.142	-.843	-.332
SS2	-5.132	2.213	1.079	.345	.593	-.234
TP	.283	-2.336	.146	-.724	.101	-.028
CA	5.929	1.626	-.395	-.226	1.016	.240
CF	.588	-.603	.525	1.222	-.545	.374
PVL2	.426	-.990	.853	-1.077	-.468	.059
VL	-.896	-3.267	-.741	.657	.399	-.240
SM2	-8.623	1.684	-1.390	-.462	-.346	.217

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

b) ANÁLISIS 2

Functions at Group Centroids

Cepas de rotíferos	Function					
	1	2	3	4	5	6
LI	4.952	2.374	-.842	.014	.662	-.029
SS2	-5.557	.883	2.001	-.063	.289	-.022
TP	.731	-1.685	-.287	.455	-.171	-.206
CA	6.076	1.988	.731	-.445	-.543	.047
CF	.154	-1.290	-.049	-.230	.003	-.159
PVL2	.528	-1.040	-.009	1.454	-.016	.188
VL	-.471	-2.494	-.388	-1.300	.110	.170
SM2	-8.958	2.665	-1.510	-.084	-.321	.018

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

TABLA 7. Cuadro de la clasificación de resultados el análisis discriminante 1, usando los caracteres de la lórica A-G.

Classification Results ^{b,c}

			Predicted Group Membership								Total
Cepas de rotíferos			LI	SS2	TP	CA	CF	PVL2	VL	SM2	
Original	Count	LI	20	0	0	5	0	0	0	0	25
		SS2	0	26	0	0	0	0	0	0	26
		TP	0	0	23	0	2	4	1	0	30
		CA	2	0	0	26	0	0	0	0	28
		CF	0	0	0	0	30	0	0	0	30
		PVL2	0	0	3	0	3	24	1	0	31
		VL	0	0	3	0	0	0	25	0	28
		SM2	0	0	0	0	0	0	0	20	20
	%	LI	80.0	.0	.0	20.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		SS2	.0	100.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		TP	.0	.0	76.7	.0	6.7	13.3	3.3	.0	100.0
		CA	7.1	.0	.0	92.9	.0	.0	.0	.0	100.0
		CF	.0	.0	.0	.0	100.0	.0	.0	.0	100.0
		PVL2	.0	.0	9.7	.0	9.7	77.4	3.2	.0	100.0
		VL	.0	.0	10.7	.0	.0	.0	89.3	.0	100.0
		SM2	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0	100.0
Cross-validated ^a	Count	LI	19	0	0	6	0	0	0	0	25
		SS2	0	26	0	0	0	0	0	0	26
		TP	0	0	21	0	2	5	2	0	30
		CA	3	0	0	25	0	0	0	0	28
		CF	0	0	0	0	30	0	0	0	30
		PVL2	0	0	4	0	3	23	1	0	31
		VL	0	0	4	0	0	0	24	0	28
		SM2	0	0	0	0	0	0	0	20	20
	%	LI	76.0	.0	.0	24.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		SS2	.0	100.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		TP	.0	.0	70.0	.0	6.7	16.7	6.7	.0	100.0
		CA	10.7	.0	.0	89.3	.0	.0	.0	.0	100.0
		CF	.0	.0	.0	.0	100.0	.0	.0	.0	100.0
		PVL2	.0	.0	12.9	.0	9.7	74.2	3.2	.0	100.0
		VL	.0	.0	14.3	.0	.0	.0	85.7	.0	100.0
		SM2	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0	100.0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 89.0% of original grouped cases correctly classified.

c. 86.2% of cross-validated grouped cases correctly classified.

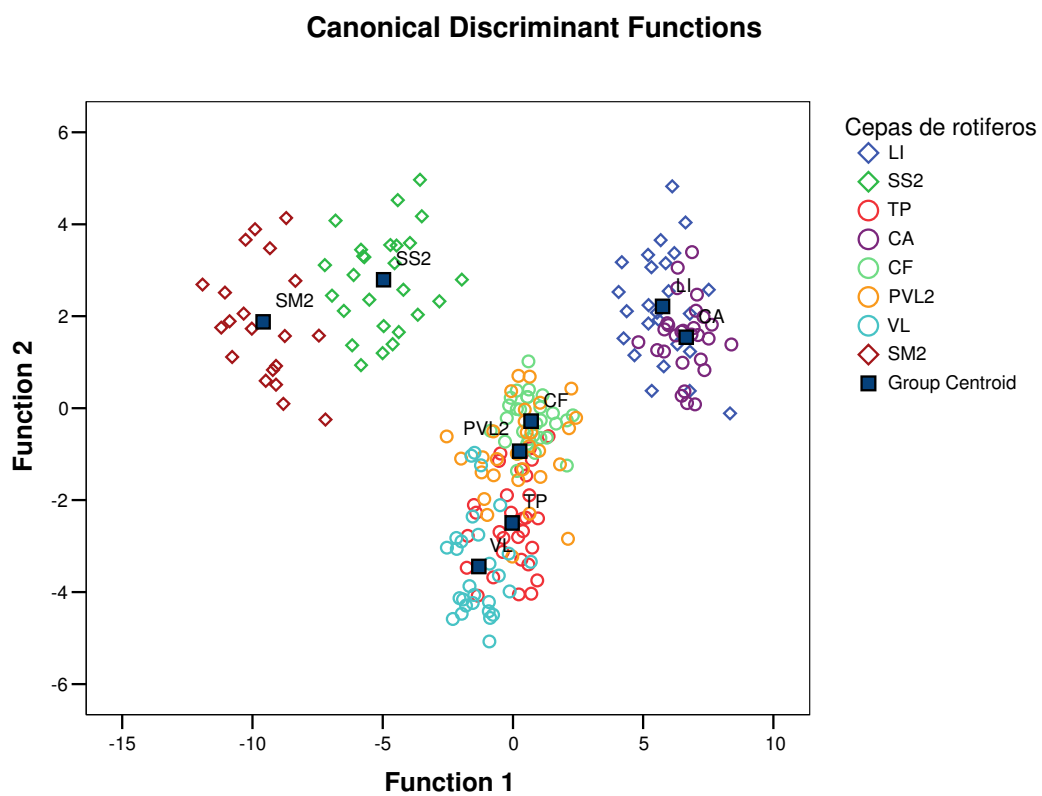


Fig. 16. Mapa territorial mostrando los resultados del análisis discriminante I realizado utilizando los caracteres A-G (Según Fu et al., 1991 a).

4.2.2 Análisis discriminante II.

En el análisis II (Tabla 8), se observa que las variables que tienen mayor coeficiente de correlación entre grupos de las medidas de la lórica y la función discriminante canónica (Corr.) son las medidas del cuerpo (A y C) y la abertura anterior de la lórica (I) que sería el “equivalente” a la medida B en el análisis I (A, $r = 0.842$; C, $r = 0.800$ e I, $r = 0.632$) y en la función 2 destaca la longitud del borde interno de la espina 2, (G, $r = 0.624$), al igual que en el análisis I.

TABLA 8. Resultados del análisis II, análisis discriminante por el método de inclusión por pasos de los caracteres de la lórica A, C, E, G-I medidos para las cepas de *Brachionus*. Solo los valores de las 2 primeras funciones. (Coef. y Corr., ídem a tabla 5). El análisis no excluyó ninguna medida en este análisis.

	FUNCION 1		FUNCION 2	
	Coef.	Corr.	Coef.	Corr.
Ln(A)	0.626	0.842 (*)	0.225	0.275
Ln(C)	0.244	0.800 (*)	-0.669	-0.152
Ln(E)	0.365	0.431	-0.248	-0.236
Ln(G)	-0.242	0.031	0.670	0.624
Ln(H)	-0.015	0.122	-0.230	0.008
Ln(I)	0.205	0.632 (*)	0.728	0.497
Eigenvalue	19.458		3.603	
%varianza	78.8		14.6	

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function					
	1	2	3	4	5	6
Ln_A	.626	.225	.094	-1.113	-.274	.264
Ln_C	.244	-.669	-.079	.998	-.673	-.185
Ln_E	.365	-.248	.464	-.288	.664	-.492
Ln_G	-.242	.670	.478	.309	-.416	-.403
Ln_H	-.015	-.230	.516	.028	.010	.941
Ln_I	.205	.728	-.464	.396	.783	.056

Structure Matrix

	Function					
	1	2	3	4	5	6
Ln_A	.842*	.275	-.027	-.254	-.372	.107
Ln_C	.800*	-.152	.001	.488	-.312	-.036
Ln_I	.632*	.497	-.189	.415	.312	.219
Ln_G	.031	.624	.653*	.223	-.299	-.209
Ln_E	.431	-.236	.612*	.035	.479	-.392
Ln_H	.122	.008	.619	.256	.146	.718*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions

Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	19.458 ^a	78.8	78.8	.975
2	3.603 ^a	14.6	93.4	.885
3	.901 ^a	3.6	97.0	.688
4	.602 ^a	2.4	99.4	.613
5	.117 ^a	.5	99.9	.324
6	.019 ^a	.1	100.0	.137

a. First 6 canonical discriminant functions were used in the analysis.

En la Fig. 17 se observan 4 grupos, pero, a comparación del análisis discriminante I, la dispersión de los datos es mayor. Los dos primeros grupos, de izquierda a derecha están conformados por *Brachionus ibericus* y *B. rotundiformis*, estos grupos tienen un ligero traslapamiento, ya que, la probabilidad de que SS2 sea clasificado correctamente como SS2 es de 96.2% y que se clasifique como SM2 es de 3.8%. Además, la cepa SM2 tiene un 100% de probabilidad de ser clasificada correctamente como SM2 (Tabla 9).

El tercer grupo está conformado por las cepas TP, PVL2, VL y CF y el cuarto grupo conformado por *Brachionus plicatilis* (L1) y por la cepa CA. L1 tiene una probabilidad del 80% de clasificarse correctamente, mientras que, la cepa CA se clasifica correctamente con una probabilidad del 89.3% (tabla 9).

TABLA 9. Cuadro mostrando la clasificación de resultados del análisis discriminante 2, utilizando los caracteres de la lórica A, C, E, G-I.

Classification Results											b,c
Cepas de rotíferos			Predicted Group Membership								Total
			LI	SS2	TP	CA	CF	PVL2	VL	SM2	
Original	Count	LI	20	0	0	5	0	0	0	0	25
		SS2	0	25	0	0	0	0	0	1	26
		TP	0	0	14	0	5	7	4	0	30
		CA	3	0	0	25	0	0	0	0	28
		CF	0	0	3	0	19	5	3	0	30
		PVL2	0	0	2	0	3	24	2	0	31
		VL	0	0	2	0	5	0	21	0	28
		SM2	0	0	0	0	0	0	0	20	20
	%	LI	80.0	.0	.0	20.0	.0	.0	.0	.0	100.0
		SS2	.0	96.2	.0	.0	.0	.0	.0	3.8	100.0
		TP	.0	.0	46.7	.0	16.7	23.3	13.3	.0	100.0
		CA	10.7	.0	.0	89.3	.0	.0	.0	.0	100.0
		CF	.0	.0	10.0	.0	63.3	16.7	10.0	.0	100.0
		PVL2	.0	.0	6.5	.0	9.7	77.4	6.5	.0	100.0
		VL	.0	.0	7.1	.0	17.9	.0	75.0	.0	100.0
		SM2	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0	100.0
Cross-validated	a Count	LI	18	0	0	6	0	1	0	0	25
		SS2	0	25	0	0	0	0	0	1	26
		TP	0	0	10	0	6	9	5	0	30
		CA	4	0	0	24	0	0	0	0	28
		CF	0	0	3	0	19	5	3	0	30
		PVL2	0	0	2	0	4	23	2	0	31
		VL	0	0	2	0	5	0	21	0	28
		SM2	0	0	0	0	0	0	0	20	20
	%	LI	72.0	.0	.0	24.0	.0	4.0	.0	.0	100.0
		SS2	.0	96.2	.0	.0	.0	.0	.0	3.8	100.0
		TP	.0	.0	33.3	.0	20.0	30.0	16.7	.0	100.0
		CA	14.3	.0	.0	85.7	.0	.0	.0	.0	100.0
		CF	.0	.0	10.0	.0	63.3	16.7	10.0	.0	100.0
		PVL2	.0	.0	6.5	.0	12.9	74.2	6.5	.0	100.0
		VL	.0	.0	7.1	.0	17.9	.0	75.0	.0	100.0
		SM2	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	100.0	100.0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 77.1% of original grouped cases correctly classified.

c. 73.4% of cross-validated grouped cases correctly classified.

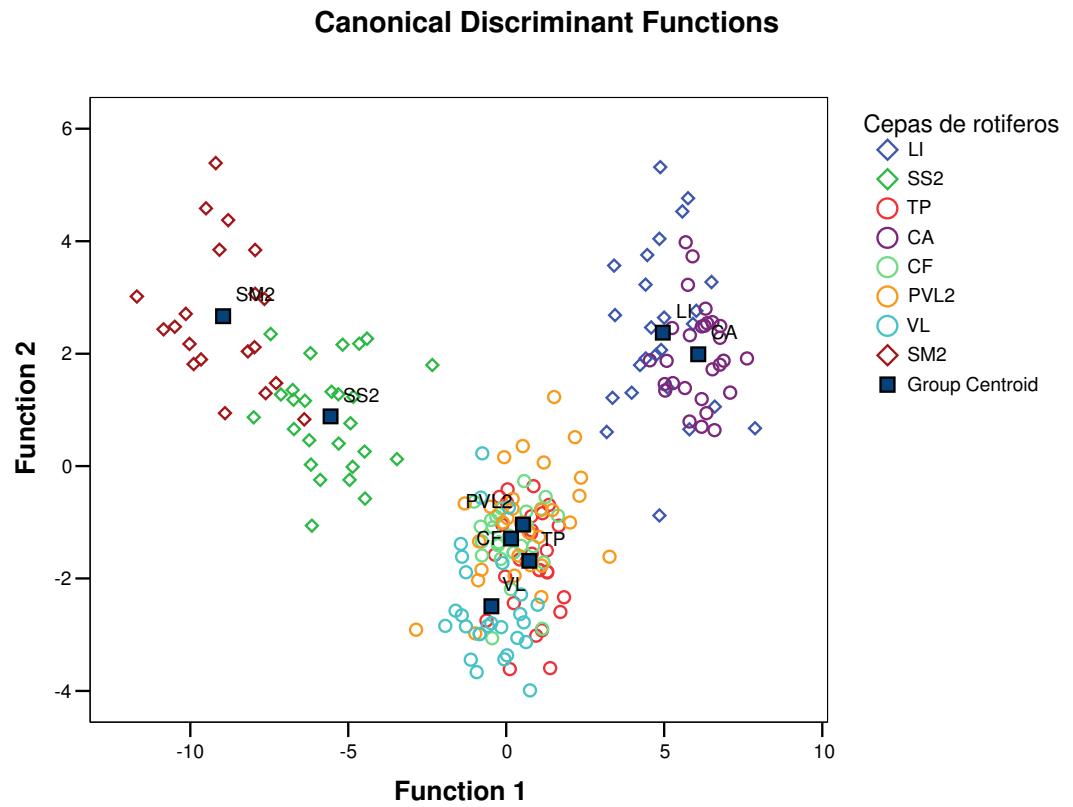


Fig. 17. Mapa territorial mostrando los resultados del análisis discriminante II realizado usando los caracteres A, C, D, E, G - I, (Según Ciro-Pérez et al., 2001).

4.2.3 Análisis de las proporciones de la variables morfométricas.

Se realizaron análisis de varianza a manera de confirmación del análisis discriminante, para esto se calcularon proporciones entre los caracteres medidos. Asimismo se agruparon las cepas tomando como base a los resultados obtenidos en el análisis discriminante. En los análisis de varianza realizados (Tabla 10) se observan que las 3 especies patrón y el grupo de cepas *Brachionus* sp. (Cepas nativas e introducidas, con excepción de la cepa CA) son diferentes estadísticamente en cuanto a la longitud de lórica (Log A) y forma relativa de la lórica (C/A) con un $P < 0.001$. Se observa también que la especie *B. rotundiformis* tiene las espinas relativamente más largas en proporción a su longitud de lórica (H/A), la especie *B. ibericus* presenta la apertura relativa de la lórica (I/A) más amplia y *Brachionus* sp. tiene una menor longitud relativa de la espina 2 en relación con la espina 3 (G/H).

TABLA 10. La media (Error Estándar) de las 5 proporciones y el logaritmo de la longitud de la lórica en micras, de las 3 especies de *Brachionus* y de las cepas que fueron agrupadas por el análisis discriminante realizado.

Variables morfométricas	<i>Brachionus plicatilis</i> (L1)	<i>Brachionus rotundiformis</i> (SS2)	<i>Brachionus ibericus</i> (SM2)	<i>Brachionus</i> sp. (VL,PVL2,TP y CF)
Log A	2.418(0.004) ^d	2.209(0.005) ^b	2.300(0.002) ^c	2.167(0.005) ^a
C/A	0.679(0.004) ^a	0.735(0.005) ^c	0.714(0.010) ^b	0.759(0.003) ^d
B/C	0.688(0.007) ^c	0.697(0.009) ^d	0.650(0.010) ^b	0.568(0.004) ^a
H/A	0.059(0.001) ^a	0.093(0.002) ^c	0.073(0.003) ^b	0.070(0.001) ^b
I/A	0.457(0.005) ^{ab}	0.465(0.005) ^b	0.491(0.007) ^c	0.447(0.003) ^a
G/H	0.862(0.025) ^a	0.871(0.021) ^a	1.090(0.029) ^b	0.685(0.009) ^c

Nota: Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre las especies entre las especies patrón y el grupo formado por las cepas peruanas VL,PVL2,TP y la cepa introducida CF, ($p > 0.001$, ANOVA - Student Newman Keuls).

Leyenda:

C/A: Forma relativa de lórica.

B/C: Proporción entre la apertura anterior del lórica y el ancho de la lórica.

H/A: Tamaño relativo de la espina izquierda 3.

I/A: Apertura anterior relativa de la lórica.

G/H: Longitud relativa de la espina 2 en relación con la espina 3.

4.3 Análisis filogenético.

En la Fig 18 se muestra el árbol filogenético obtenido, donde se observa que las cepas PVL1 y CHL están asociadas a un mismo ancestro y tienen la misma distancia genética, este resultado está sustentado por un porcentaje de “Bootstrap” del 100%. La cepa VL, en este cladograma, es cercana a *Brachionus ibericus* pero el porcentaje de bootstrap es bajo (26%). La cepa CA esta relacionada con L1 (*Brachionus plicatilis s.s.*), esta relación está bien sustentada (Bootstrap 100%).

En el segundo cladograma (Fig. 19 a y b) se observa nuevamente que la cepa CA (cepa comercial) está más relacionada filogenéticamente con *Brachionus plicatilis s.s.* de la península ibérica (Bootstrap 100%), y no con ninguno de los otros linajes. Las cepas PVL1 y CHL fueron agrupadas dentro del linaje CAYMAN con un 99% de bootstrap, distanciada de *Brachionus rotundiformis* y, por último, la cepa VL fue incluida en el linaje ALMENARA (100% bootstrap).

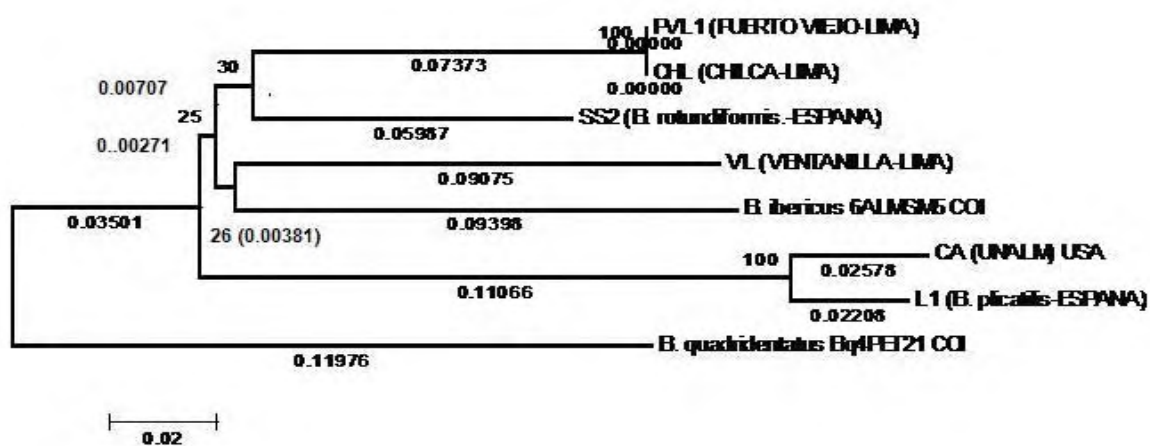


Fig. 18. Árbol filogenético de las cepas peruanas y patrón, obtenido utilizando las secuencias obtenidas para el marcador COI, construido utilizando el método Neighbor-joining. Se muestran las distancias genéticas entre las cepas. En los nodos se muestran los porcentajes del bootstrap para 1000 repeticiones.

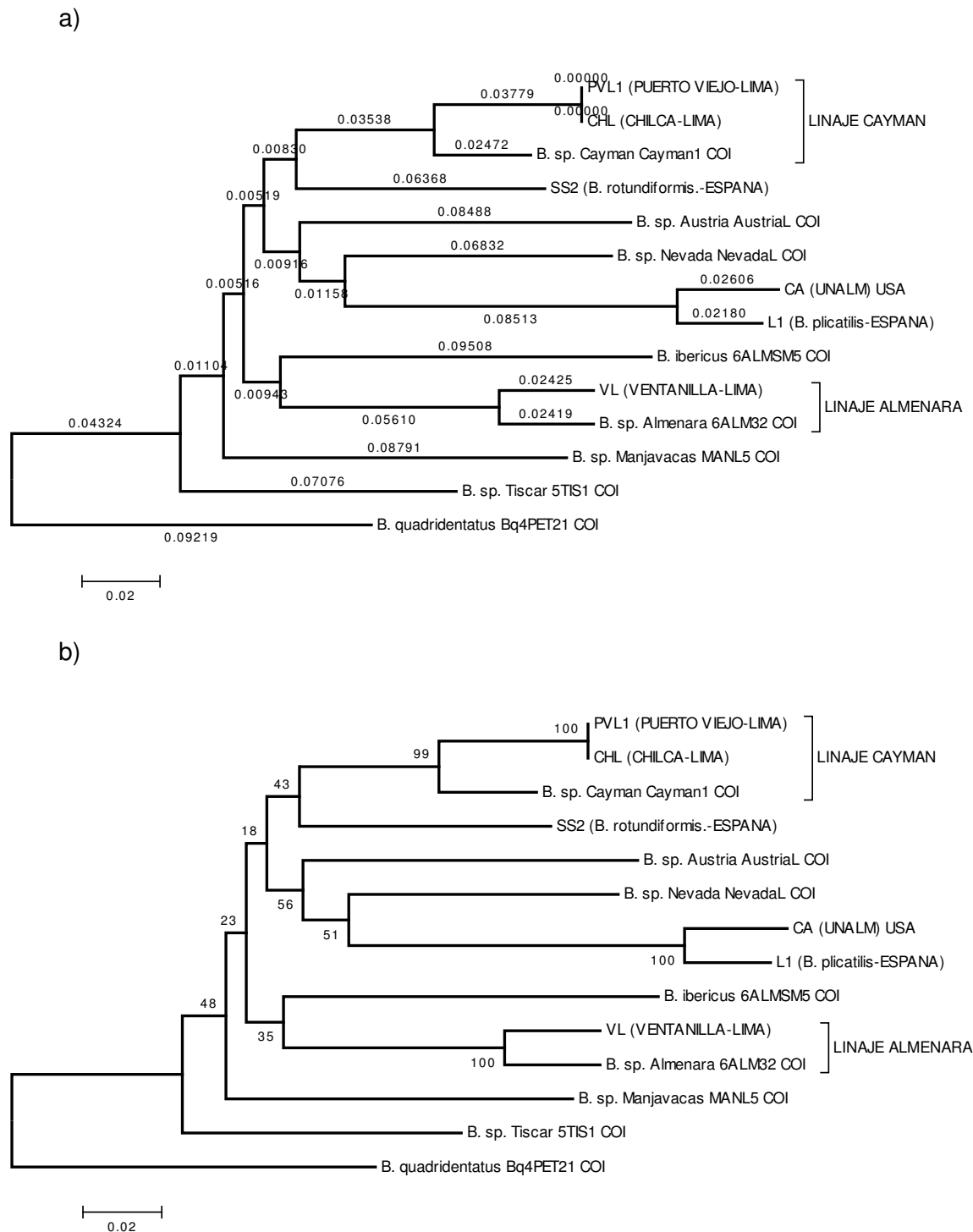


Fig. 19. Cladograma de las cepas peruanas, patrón y secuencias de los linajes del complejo *Brachionus plicatilis* obtenido de las secuencia para el marcador COI, construido utilizando el modelo Log Det (Tamura-Kumar) y el método Neighbor-joining.

- a) Se muestran los valores de las distancias genéticas de cada rama
 b) En los nodos se muestran los porcentajes del bootstrap para 1000 repeticiones.

5. DISCUSIÓN

5.1 Morfometría.

Los resultados del análisis morfométrico indican que los caracteres que discriminaron mejor las cepas fueron: La longitud de la lórica (A), ancho de la lórica (C), principalmente; así como también la abertura anterior de la lórica (I) y la distancia entre las dos espinas 3 (B). Estos resultados concuerdan con Fu *et al.* (1991a), quienes obtuvieron 2 grandes grupos analizando 67 cepas de rotíferos basados en la longitud de la lórica (A). Adicionalmente, Hagiwara *et al.* (1995) utilizando los mismos caracteres probaron que las cepas muy pequeñas (cepas SS) no formaron un nuevo grupo y fueron incluidas en *Brachionus rotundiformis*. Asimismo Ciro-Pérez *et al.* (2001), analizaron cepas de la península ibérica, encontrando que las diferencias en morfología entre dichas cepas se debe a la longitud y ancho de la lórica (A y C, respectivamente) y además, reportaron que la abertura de la lórica (I) también tuvo un fuerte poder discriminante, este resultado concuerda con los obtenidos en el presente trabajo.

En el análisis discriminante I (Fig. 16) se formaron 4 grupos, 3 corresponden a las cepas patrón (L1, SS2 y SM2), donde el grupo L1 además incluye la cepa introducida CA, y el cuarto agrupa las cepas peruanas PVL2, TP y VL y la introducida CF. Estos resultados difireren con los obtenidos por Ciro-Pérez *et al.* (2001) para el análisis I, ya que solo se formaron 2 grupos entre sus cepas ibéricas, un grupo conformado por las cepas tipo L (*Brachionus plicatilis*) y el otro por las tipo SM (*B. ibericus*) y SS (*B. rotundiformis*), a diferencia de nuestros resultados donde se separaron bien las especies patrón y además se formó un cuarto grupo que incluye las cepas nativas y a la cepa introducida CF. Ciro-Pérez *et al.* (2001) atribuye este resultado a que el carácter B es afectado por las deformaciones de las espinas debido a la fijación, decidiendo reemplazarlo por el carácter I (abertura de la lórica) en el análisis II. En nuestros resultados se separaron los 4 grupos y no solo 3, debido posiblemente a que no se produjeron deformidades de espinas.

En el análisis discriminante II (Fig. 17) obtuvimos también 4 grupos (mencionados anteriormente), lo cual concuerda con los de Ciro-Pérez *et al.* (2001), quienes separaron sus cepas en tres grupos bien definidos que corresponden plenamente a las 3 especies descritas, ya que en este análisis se reemplazó el carácter B por el I. En nuestros resultados no se observó mayor

diferencia con el análisis I, solo que el agrupamiento fue menor. En conclusión podemos decir que el cuarto grupo formado en nuestro análisis morfométrico no correspondería a ninguna de las especies patrón utilizadas.

En relación a las longitudes de lórica, las cepas colectadas en Perú (TP, PVL2 y VL) y la cepa CF presentan un tamaño intermedio entre *Brachionus plicatilis* y *B. rotundiformis*. Por esta característica se pensó que podrían agruparse con la especie *B. ibericus* (Cepa SM2), sin embargo, el análisis separó estas cepas en un cuarto grupo, basado en la longitud y ancho de la lórica principalmente (A y C, respectivamente). Por lo tanto, podemos afirmar que las cepas nativas peruanas estudiadas pertenecen al tipo mediano (M), pero que no corresponden a la especie *B. ibericus*. Lo cual podría utilizarse de manera práctica en acuicultura para diferenciar nuestras cepas nativas de las especies *Brachionus plicatilis* s. s. y *B. rotundiformis*, conocidas por los acuicultores como tipo “S” y “L”, respectivamente).

La cepa introducida CA (Cepa comercial que fue adquirida como *B. plicatilis*) presenta una morfología muy similar a la especie *Brachionus plicatilis* s.s. Según los resultados morfométricos (Fig. 16 y 17), en la tablas de clasificación de resultados (Tablas 7 y 9) se observa que hay porcentajes de 10.7 y 14.3% de clasificar a CA como L1, este porcentaje es alto si se compara con los resultados de clasificación de las especies *B. rotundiformis* (SS2) y *B. ibericus* (SM2) en que la probabilidad de clasificar erróneamente a *B. rotundiformis* es de 0 y 3.8%, en los 2 análisis, y a *B. ibericus* es de 0% en ambos análisis. Esto indicaría que la cepa introducida CA corresponde desde el aspecto morfológico a *Brachionus plicatilis* s.s.

Los resultados del análisis de las proporciones de las variables morfométricas mostrados en la tabla 10, confirman las agrupaciones de los análisis morfométricos. Adicionalmente podemos decir que, la especie *B. rotundiformis* tiene las espinas más largas en proporción con la lórica (H/A), esto concuerda con la descripción hecha por Ciro-Pérez *et al.* (2001) y no hay diferencia significativa para este carácter entre la especie *B. ibericus* y *Brachionus* sp. La proporción I/A (Apertura relativa de la lórica) de *Brachionus ibericus* es significativamente mayor que en las especies patrón y *Brachionus* sp., esto esta de acuerdo con Ciro-Pérez *et al.* (2001), quien lo incluye como una característica de diagnóstico en la descripción de la especie. Con respecto el grupo de cepas

peruanas y CF (*Brachionus* sp.) podemos decir que el I/A no es significativamente diferente a *B. plicatilis* pero es diferente a *B. rotundiformis* y *B. ibericus*, esto confirma que este grupo no tiene la abertura de la lórica ancha, como si se observa en *B. ibericus*, lo cual sería una buena forma de diferenciarla de esta especie independientemente de la edad individuo.

5.2 Análisis Filogenético.

Existe evidencia que el complejo *Brachionus plicatilis* esta conformado por linajes con especies crípticas, las cuales han evolucionado manteniendo su morfología (Estrés Morfológica) como es el caso del linaje Manjavacas y *B. plicatilis*, ambos poseen el morfotipo L, pero que son filogenéticamente divergentes (Gómez *et al.*, 2002, Campillo *et al.*, 2005; Fontaneto *et al.*, 2007). Por lo tanto, de acuerdo con esta evidencia, las similitudes morfológicas entre las cepas peruanas, no asegura que se trate de una misma especie en todos los casos. Por ejemplo, las cepas VL y CHL, fueron incluidas en dos clados distintos *Brachionus* sp. ALMENARA y *Brachionus* sp. CAYMAN, respectivamente (Fig. 19). La cepa VL esta presente en una laguna de bajas salinidades (Tabla 2), lo cual concuerda con observaciones realizadas para el linaje ALMENARA en la Península Ibérica (Serra *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2002; Ortells *et al.*, 2003). La cepa CHL no fue incluida en el análisis morfométrico por no ser una cepa útil en acuicultura debido a sus pobres tasas de crecimiento, pero se puede afirmar que la morfología es similar con las demás cepas peruanas. Por otro lado, la cepa PVL1 fue también adscrita al linaje *Brachionus* sp. CAYMAN y en este análisis poseen la misma distancia genética que la cepa CHL, aunque provienen de cuerpos de agua distintos, pero geográficamente cercanos (10 Km. aproximadamente).

La cepa CA se encuentra distante de los linajes *Brachionus* sp. NEVADA (0.06832) y *Brachionus* sp. AUSTRIA (0.08488) (Fig. 19 a), lo que indicaría que esta cepa corresponde a *B. plicatilis* s. s. Dooms *et al.* (2006), analizaron la misma cepa, utilizando la técnica DGGE (Electroforesis en gel en gradiente denaturante) donde concluyeron que CA pertenece a *Brachionus plicatilis* s.s. Estos resultados son importantes ya que por primera vez en el Perú se tiene una cepa del complejo *B. plicatilis*, determinada y disponible para realizar estudios con resultados repetibles y comparables para investigación en acuicultura, ecotoxicología, ecología, etc.

La cepa PVL1 es de una colecta previa a PVL2, por lo que no podemos asegurar que pertenezcan a la misma cepa, se necesita realizar el análisis filogenético para dilucidar esta interrogante. Independientemente de lo anterior, podemos afirmar que el análisis morfométrico nos permite discriminar bien las cepas peruanas de las ibéricas (SS2, L1 y SM2), mas no distinguir entre algunos linajes, debido a que poseen morfologías muy similares, y se necesitarían análisis morfológicos más detallados, empleando por ejemplo microscopía electrónica de barrido o morfometría geométrica (Fontaneto *et al.* 2007).

La estasis morfológica parece ser la explicación a la aparente baja diversidad de rotíferos, resultando más comunes los complejos de especies en este phylum, como en otros organismos acuáticos, de lo que antes se pensaba. Esto fue descubierto debido a la aplicación de técnicas moleculares. Así mismo, la aparente adaptación fisiológica y el comportamiento reproductivo a través de comunicación sexual química podría ser clave para explicar la conservación de la morfología de los rotíferos en el tiempo, asociado con adaptación local, diversificación poblacional y especiación críptica (Gómez *et al.* 2002).

Con respecto a la formación de huevos de resistencia o quistes en las cepas de rotíferos estudiadas (TP, PVL1, PVL2, CHL, VL y CF), es que estos se forman y permanecen en el interior de la lóricas hasta que el individuo finalmente muere (Fig. 15). Esta característica fue observada en *Brachionus ibericus* por Serra *et al.* (1998) y Ciro-Pérez *et al.* 2001, siendo una de las formas de distinguir a esta especie de *B. plicatilis* y de *B. rotundiformis*, ya que estas especies cargan el huevo de resistencia fuera de la lórica. Esta característica da una idea de las diferencias adaptativas de las especies nativas que las hace diferentes de *Brachionus plicatilis* y *B. rotundiformis*.

6. CONCLUSIONES

1. Los caracteres que permitieron discriminar las cepas del complejo *Brachionus plicatilis* estudiadas en los análisis discriminantes I y II fueron: La longitud (A) y ancho de la lórica (C), la distancia entre las dos espinas 3 (B), la abertura anterior de la lórica (I) y la longitud del borde interno de la espina 2 (G)
2. El análisis morfométrico de las cepas peruanas (Tumbes, Ventanilla y Puerto Viejo 2) y la cepa procedente de Chile (CF) revela que estas son diferentes morfológicamente de las especies utilizadas como patrón (*Brachionus plicatilis* s.s., *B. rotundiformis*, *Brachionus ibericus*).
3. El análisis morfométrico indica que la cepa comercial CA pertenece a la especie *Brachionus plicatilis* s.s., lo cual es confirmado por el análisis filogenético.
4. El análisis filogenético revela que la cepa VL (Ventanilla) pertenece al linaje *Brachionus* sp. "ALMENARA" y las cepas CHL (Chilca) y PVL1 (Puerto Viejo 1) al linaje *Brachionus* sp. "CAYMAN".
5. Se reporta por primera vez para el Perú, la presencia de rotíferos pertenecientes a los linajes *Brachionus* sp. "CAYMAN" y *Brachionus* sp. "ALMENARA".

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BARRENO J. C., 1988. Sustitución de *Artemia* sp. por el rotífero *Brachionus plicatilis* sobre el cultivo larval de *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- BAXEVANIS, A. D., TRIANTAPHILLIDYS, G. V. KAPPAS, I., I., TRIANTAPHILLIDYS, A., TRIANTAPHILLIDYS, C. D. & ABATZOPOULUS, T. J. 2005. Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16s r RNA RPLF analysis. JZS. **43** (3), 189-198).
- CAMPILLO, S.; GARCIA-ROGER, E. M., MARTINEZ-TORRES, D. & SERRA, M. 2005. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* complex. Hydrobiologia, 546:181-187.
- CANDREVA, P., DHERT, P., NOVELLI, A. & BRISSI, D., 1996. Potential gains through alimentation nutrition improvements in the hatchery. In: Chatain, B., Sargalia, M., Sweetman, J., Lavens, P. (Eds.), Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects. An International Workshop, 16–18 October 1996, Verona, Italy, vol. **388**. European Aquaculture Society, pp. 148–159.
- CAMARGO, W. N., ELY, J. S., SORGELOOS, P., 2003. Morphometrics characterization of Thalassohaline *Artemia franciscana* populations from the Colombian caribbean. Journal of Biogeography. **30**: 697-702.
- CIROS-PEREZ, J., GOMEZ, A., & SERRA, M. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. Journal of Plankton Research, **23** (12):1311-1328.

- CHINCHAYAN, M., 1996. Cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* y su consumo por el rotífero *Brachionus plicatilis* (Línea S). Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- DEHASQUE, M., OOGHE, B., WILLE, M., CANDREVA, P., CLADAS, P. & LAVENS, P., 1997. Automation of live food in industrial hatcheries: zootechnics and economics. *Aquacult. Int.* **5**, 179–182.
- DHERT, Ph., ROMBAUT, G., SUANTIKA, G. & SORGELOOS, P. 2001. Advances of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*. **200**: 129-146.
- DOOMS, S.; PAPAKOSTAS, S., HOFFMAN, S., DELBARE, D., DIERCKENS, K., TRIANTAFILLIDIS, A., DE WOLF, T., VADSTEIN, O., ABATZOPOULUS, T. J., SOGELOOS, P. & BOSSIER, P. 2006. Denaturin Gradient Gel Electroforesis (DGGE) as a tool for the characterization of *Brachionus sp.* Strains. *Aquaculture*. **262**(1): 29-40.
- FONTANETO, D.; GIORDANI, I.; MELONE, J. & SERRA, M. 2007. Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiología*. **583**: 297-307.
- FU, Y., HIRAYAMA, K. & NATSUKARI Y. 1991a. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O: F: Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **151**: 29-41.
- FU, Y., HIRAYAMA, K. & NATSUKARI Y. 1991b. Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F Müller. *Mar. Biol. Ecol.* **151**: 43-56.
- FU, Y., HAGIWARA, A. & HIRAYAMA, K. 1993. Crossing between seven strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**: 2009-2016.
- GÓMEZ, A., TEMPRANO, M. & SERRA, M. 1995. Ecological genetics of a cyclical parthenogenic in temporary habitats. *J. Evol. Biol.* **8**: 601-622.

- GOMEZ, A. & SNELL, T. W., 1996. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). J. Evol. Biol. **9**: 353-964.
- GÓMEZ, A., CLABBY, C. & CARVALHO, G. R. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in a cyclically parthenogenetic rotifer, *Brachionus plicatilis*. Molecular Ecology **7**: 1619-1621.
- GÓMEZ, A., CARVALHO G. R. & LUNT, D. H. 2000. Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: Mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological sciences **267**: 2189-2197.
- GÓMEZ, A.; SERRA, M.; CARVALHO, G., R. & LUNT, D., H. 2002. Speciation in ancient cryptic species complexes: Evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (ROTIFERA). Evolution, **56** (7): 1431-1444.
- GÓMEZ, A. 2005. Molecular ecology of rotifers: from population differentiation to speciation. Hydrobiologia **546**:83-99.
- GUILLARD, R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Culture of marine invertebrates animals. W.L. Smith & M.H. Chanley eds. 29 - 60 . Plenum Press.
- HAGIWARA, A., KOTANI, T., SNELL T. W., ASSAVA-AREE, M. & HIRAYAMA, A. 1995. Morphology, reproduction and genetics of the tropical minute marine rotifer *Brachionus* strains. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **194**:25-37.
- HAGIWARA, A., GALLARDO, W. G., ASSAVAAREE, M., KOTANI, T. & ARAUJO, A. B. 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. Aquaculture **200**, 111-127.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA & A. C. WILSON, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved

- primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**: 6196–6200.
- HYRAYAMA, K. & RUMENGAN I. F. M. 1993. The fecundity patterns of S-type and L-type rotifers of *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia **255/256** (dev. Hydrobiol.83): 153-157.
- KUMAR, S., TAMURA, K & NEI, M. 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics **5**:150-163.
- MONTOYA, H. 2004. Flora y Ecología algal del ecosistema lagunar de Puerto Viejo, Departamento de Lima: cyanophyta, Euglenophyta, Chlorophyta, Cryptophyta, Prasinophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Rhodophyta. Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- MURA, G. , KAPPAS, I. BAXEVANIS, A. D., MOSCATELLO, S. D'AMICO, Q., LOPEZ, G.M., HONTORIA, AMAT, F., ABATZOPOULUS, T. J. 2006. Morphological and molecular data reveal the precesence of the invasive *Artemia franciscana* in Margeritha di Savoia Salterns (Italy). Internat. Rev.. Hydrobiol. **91** (6), 539-554.
- NAGATA W. D. 1989. Nitrogen flow through a Brachionus/Chlorella mass culture system. Hydrobiologia. **186/187**: 401-408.
- NORUSIS, M. J., 1993, SPSS for Windows Professional Statistic Release 6.0. SPSS Inc. 385 pp.
- ORTELLS, R.; GÓMEZ, A. & SERRA, M. 2003. Coexistence of cryptic rotifer species: ecological and genetic characterization of *Brachionus plicatilis*. Freshwater Biology **48**: 2194-2202.
- PISUA L. A. 1984. Estudios preliminares sobre el cultivo masivo de *Brachionus plicatilis* (Rotífera). Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

- QUESQUEN, R. 1996. Evaluación del crecimiento de Artemia del departamento de Lima. Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero. Universidad Nacional del Callao. Callao –Perú.
- RUMENGAN, I. F. M., KAYANO & HIRAYAMA K. 1991. Karyotypes of S-type and L-type rotifers *Brachionus plicatilis* Müller, O.F. J. exp. Mar. Biol. Ecol. **154**:171-176.
- RUMENGAN, I.F, WAROUW, V. & HAGIWARA A. 1998. Morphometry and resting egg production potential of the tropical ultra-minute rotifer *Brachionus rotundiformis* (Manado strain) fed different algae. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ., **79**: 31-36.
- SEGERS, H. 1995. Nomenclature Consequences Of Some Recent Studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifer, Brachionus). Hydrobiologia. **313/314**: 121-127.
- SEGERS, H. 2002. The nomenclature of Rotifera: annotated checklist of valid family- and genus-group names. J. Nat. His. **36**: 631-640.
- SEGERS, H. 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. Zootaxa. **1564**: 1–104.
- SERRA, M., GÓMEZ, A., & CARMONA, M. J. 1998. Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. Hydrobiologia. **387/388** :373-384.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. 1981. Biometry. W,H. Freeman and Co., San Francisco, California. USA. 859 pp.
- SUANTIKA, G., 2001. Development of a recirculation for the mass culturing of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Chapter II pp: 14-19. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Agricultural and Applied Biological Sciences. University of Gent-Belgium.
- SUATONI, E., SAVERIO, V., SEAN, R., SNELL, T. & ADALGISA, C. 2006,

An analysis of species boundaries and biogeographic patterns in a cryptic species complex: The rotifer—*Brachionus plicatilis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**:86–98.

THEILACKER, G. H. & Mc MASTER M. I. 1971. Mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as a food for larval anchovies. *Mar. Biol.* **10**:183-188.

TRIANANTAPHYLLIDIS G. V.; CRIEL, G. R. J.; ABATZOPOULOS, T. J. & SORGELOOS, P. 1997. International Study on Artemia. LIII. Morphological Study of Artemia with emphasis to old world strains. I. Bisexual populations. *Hydrobiologia* **357**: 139-153.

WALLACE, R., SNELL, T., RICCI, C. & NOGARDY, T. 2006. "ROTIFERA: Biology, ecology and systematics. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world". Second edition. Number 23. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.